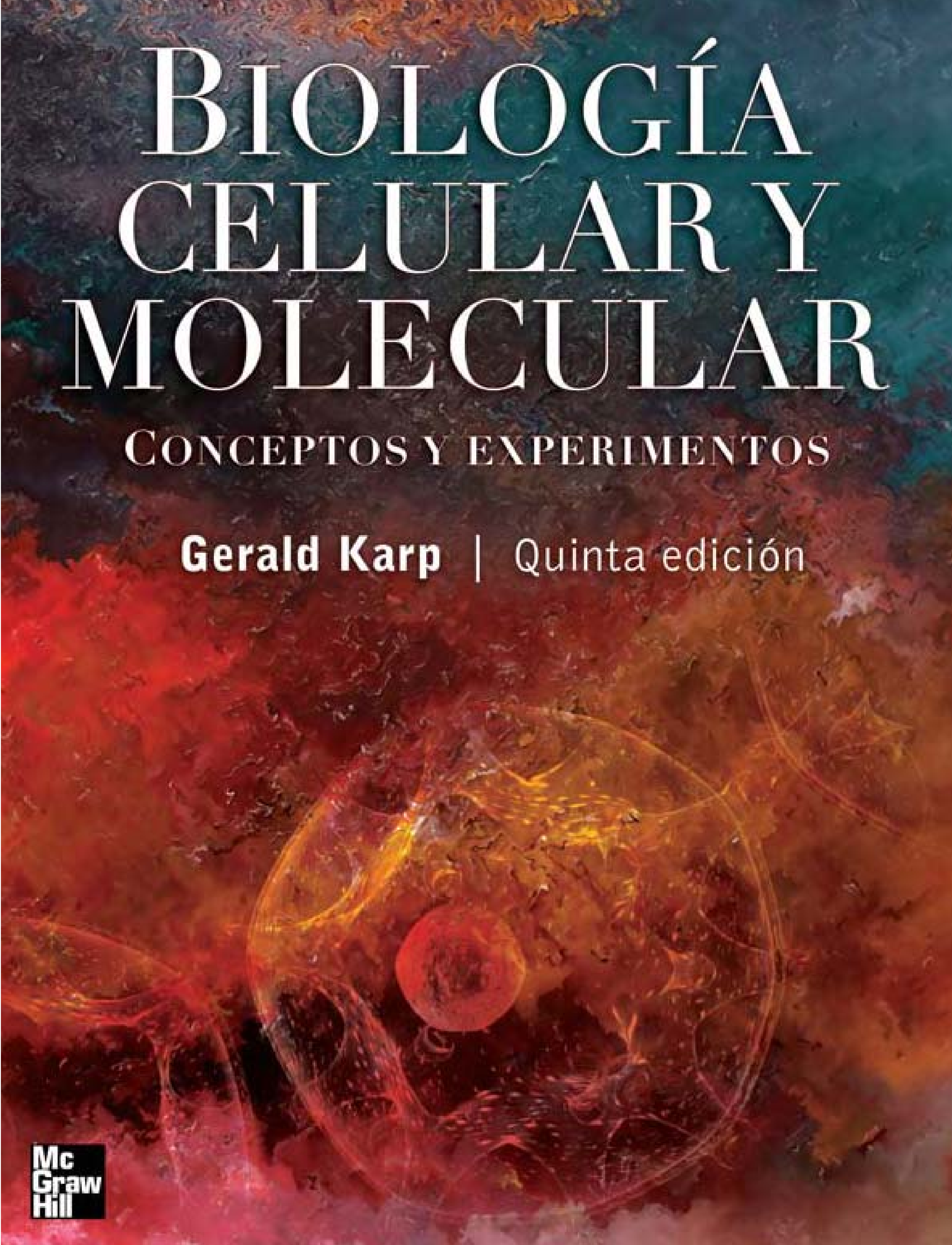


BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
CONCEPTOS Y EXPERIMENTOS
Gerald Karp | Quinta edición
Mc Graw Hill

Biología celular y molecular

Conceptos y experimentos

Para Patsy y Jenny

Acerca del autor

Gerald C. Karp recibió el título de licenciado en UCLA y el grado de Ph.D. de la *Washington University*. Realizó investigación posdoctoral en el *Colorado Medical University Center* antes de unirse al cuerpo docente de la *Florida University*. Es autor de numerosos artículos científicos sobre la célula y la biología molecular del desarrollo incipiente. Entre los temas que le interesan están la síntesis del RNA en las primeras fases embrionarias, el movimiento de las células del mesénquima durante la gastrulación, y la determinación celular en mohos deslizantes. Durante 13 años impartió cursos de biología celular, molecular y del desarrollo en la *Florida University*. En este periodo escribió un libro sobre biología del desarrollo con N. John Berrill, y otro sobre biología celular y molecular. Dado que le resultó imposible ser profesor de tiempo completo y autor simultáneamente, renunció a su cátedra para concentrarse en escribir. Espera revisar este libro cada tres años.

BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

CONCEPTOS Y EXPERIMENTOS

Gerald Karp | Quinta edición

Traducción:
Juan Roberto Palacios Martínez

MÉXICO • BOGOTÁ • BUENOS AIRES • CARACAS • GUATEMALA
LISBOA • MADRID • NUEVA YORK • SAN JUAN • SANTIAGO • SAO PAULO
AUCKLAND • LONDRES • MILÁN • MONTREAL • NUEVA DELHI
SAN FRANCISCO • SIDNEY • SINGAPUR • ST. LOUIS • TORONTO

Director editorial: Javier de León Fraga
Editor sponsor: Camilo Heras
Corrección de estilo: Armando Ruiz Calderón
Supervisora de edición: Norma García Carbajal
Diseño de portada: Eleazar Maldonado
Composición y formación: Arturo Rocha Hernández
Supervisora de producción: Ángela Salas Cañada

NOTA

La medicina es una ciencia en constante desarrollo. Conforme surjan nuevos conocimientos, se requerirán cambios de la terapéutica. El (los) autor(es) y los editores se han esforzado para que los cuadros de dosificación medicamentosa sean precisos y acordes con lo establecido en la fecha de publicación. Sin embargo, ante los posibles errores humanos y cambios en la medicina, ni los editores ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación de la obra garantizan que la información contenida en ella sea precisa o completa, tampoco son responsables de errores u omisiones, ni de los resultados que con dicha información se obtengan. Convendría recurrir a otras fuentes de datos, por ejemplo, y de manera particular, habrá que consultar la hoja informativa que se adjunta con cada medicamento, para tener certeza de que la información de esta obra es precisa y no se han introducido cambios en la dosis recomendada o en las contraindicaciones para su administración. Esto es de particular importancia con respecto a fármacos nuevos o de uso no frecuente. También deberá consultarse a los laboratorios para recabar información sobre los valores normales.

BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
Conceptos y experimentos

McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
A subsidiary of The McGraw-Hill Companies, Inc.
Prolongación Paseo de la Reforma 1015, Torre A, Piso 17, Col. Desarrollo Santa Fe,
Delegación Álvaro Obregón
C. P. 01376, México, D.F.
Miembro de la Cámara Nacional de la Industria Editorial Mexicana, Reg. No. 736

ISBN 13: 978-970-10-6925-7
ISBN edición anterior: 970-10-5376-1

Translated from the fifth English edition of:
Cell and Molecular Biology. Concepts and Experiments

ISBN 13: 978-0-470-04217-5
ISBN 10: 0-470-04217-6

1234567890 08765432109
Impreso en México Printed in Mexico

Prefacio a la quinta edición

Antes de comenzar a trabajar en la *primera* edición de este texto, elaboré varios lineamientos básicos para el tipo de libro que planeaba escribir.

- Deseaba un texto adecuado para un curso introductorio de biología celular y molecular que pudiera cubrirse en un semestre o uno o dos trimestres. Resolví elaborar un texto de unas 800 páginas que no abrumara o desalentara a los estudiantes de este nivel.
- Deseaba un libro basado en conceptos fundamentales, como la relación entre estructura y función moleculares, el carácter dinámico de los organelos celulares, el uso de energía química para llevar a cabo las actividades celulares y asegurar la biosíntesis macromolecular precisa, la unidad y diversidad a los niveles macromolecular y celular, y los mecanismos que regulan las actividades celulares.
- Pretendía un volumen que se basara en la conducta experimental. La biología celular y molecular es una ciencia experimental y, al igual que la mayoría de los instructores, pensé que los estudiantes debían adquirir cierta información sobre la manera en que obtenemos el conocimiento. Con esta idea en mente, decidí abordar la naturaleza experimental de este tema en dos formas. A medida que escribí cada capítulo, incluí suficientes pruebas experimentales para justificar muchas de las conclusiones que se han inferido. En el transcurso de la elaboración del texto describí las características sobresalientes de las técnicas experimentales y las metodologías de investigación fundamentales. Por ejemplo, los capítulos 8 y 9 incluyen secciones de introducción sobre técnicas que han resultado muy importantes en el análisis de las citomembranas y el citoesqueleto, respectivamente. Incluí en el cuerpo de los capítulos comentarios breves sobre experimentos seleccionados de gran importancia para reforzar la base experimental de nuestros conocimientos. Comenté los aspectos más detallados de las metodologías en el capítulo final porque: a) no deseaba interrumpir el flujo del comentario de un tema con una sección tangencial extensa sobre tecnología y b) me di cuenta que los diferentes instructores prefieren comentar una tecnología particular en relación con diferentes temas.

  Para los estudiantes e instructores que desearan conocer la metodología experimental con mayor profundidad, incluí la sección Vías experimentales al final de cada capítulo. Cada uno de estos recuadros describe algunos de los hallazgos experimentales clave que condujeron a la comprensión actual de un tema particular cuya importancia es relevante para el capítulo en cuestión. Debido a que su objetivo es limitado, puede considerarse con cierto detalle el diseño de los experimentos. Las figuras y los cuadros que se proporcionan en estas secciones son con frecuencia los que se publicaron en el artículo de investigación original, lo cual brinda al lector la oportunidad de examinar los datos originales y reconocer que su análisis no va más allá de su significado. Las Vías experimentales ilustran asimismo la naturaleza gradual del descubrimiento científico y muestran cómo el resultado de un estudio genera preguntas que proporcionan la base para estudios subsecuentes.
- Deseaba un texto interesante y fluido. Con el fin de que el libro fuera más relevante para los estudiantes que todavía no concluyen sus cursos, en particular para los médicos aún sin graduarse, incluí Perspectiva humana. Estas secciones muestran que, casi sin excepción, todos los trastornos humanos pueden seguirse hasta la alteración de las actividades celulares y moleculares. Más aún, evidencian la relevancia de la investigación básica como la vía para comprender y, finalmente, tratar la mayoría de los trastornos. Por ejemplo, en el capítulo 11, Perspectiva humana describe cómo los siRNA pequeños y sintéticos pueden ser una herramienta nueva y valiosa en la terapéutica del cáncer y enfermedades virales, incluido el sida. En el mismo capítulo, el lector conocerá cómo se descubrió la acción de estos RNA en estudios de nematodos. Resulta obvio que nunca es posible predecir la importancia práctica de la investigación básica en biología celular y molecular. Asimismo, durante todo el texto intenté incluir información relevante sobre biología humana y aplicaciones clínicas.
- Deseaba un programa de ilustraciones de alta calidad que llevara a los estudiantes a visualizar procesos celulares y moleculares complejos. Para satisfacer este objetivo, muchas de las figuras se "escalonaron" de tal manera que la información pudiera descomponerse con mayor facilidad en partes manejables. En las figuras o el texto correspondiente se describen los acontecimientos que ocurren en cada paso. Asimismo, busqué incluir un gran número de micrografías de tal modo que los estudiantes pudieran ver las representaciones actuales de la mayor parte de los temas que se discuten. Entre las ilustraciones se incluyen muchas micrografías de fluorescencia para mostrar las propiedades dinámicas de las células o proporcionar un medio para localizar una proteína o una secuencia de ácido nucleico específica. Siempre que fue posible, intenté relacionar los dibujos de línea con las micrografías para ayudar a los estudiantes a comparar versiones esquematizadas y reales de una estructura.

Los cambios más importantes en la quinta edición pueden delinearse como sigue:

- El cúmulo de información sobre biología celular y molecular cambia de manera constante, lo que representa buena parte del entusiasmo que sentimos por nuestro campo de estudio. Aunque sólo han transcurrido algunos años desde la publicación de la cuarta edición, se han modificado en mayor o menor grado casi todos los comentarios en el texto. Esto se llevó a cabo sin incrementar el volumen de los capítulos.
- Se revisó cada ilustración de la cuarta edición, y varias de las que se utilizaron de nueva cuenta en la quinta edición se modificaron en cierto grado. Muchos de los dibujos de la cuarta edición se suprimieron a fin de disponer de más espacio para otros nuevos. Los instructores han mostrado una

aprobación particular por las figuras que yuxtaponen el dibujo de línea y las micrografías y en la quinta edición se amplió el uso de este estilo de ilustración. En conjunto, la quinta edición contiene más de 60 micrografías e imágenes generadas por computadora nuevas, todas proporcionadas por la fuente original.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a Peter van der Geer del Department of Chemistry and Biochemistry de la *California University* en San Diego y a Helen Kreuzer Martin del *Pacific Northwest National Laboratory*. Peter fue el principal responsable de revisar el capítulo 15 en la cuarta y la quinta ediciones. Helen se encargó de reorganizar y actualizar las secciones 12 a 18 del capítulo 18.

Hay muchas personas en John Wiley & Sons que hicieron aportaciones valiosas a este libro. Agradezco especialmente a Geraldine Osnato, notable editora del proyecto. Siempre que necesité consejo, sentí la urgencia de gritar y quejarme airada y largamente o tuve la ocasión de pedir ayuda a Wiley, recurrí a ella. Gracias, Geraldine, por tu sabio consejo y aliento. Gracias también por dirigir el desarrollo de los diversos suplementos que ahora se ofrecen con este libro. Los suplementos impresos escritos por Nancy Pruitt y Joel Piperberg, antes descritos, siempre han sido excelentes recursos para estudiantes e instructores y, bajo la dirección de Geraldine, los suplementos en Internet también se han convertido en un recurso invaluable. De manera especial, estoy en deuda con el personal de producción de Wiley, que son lo mejor. Barbara Russiello, editora de producción, ha sido el sistema nervioso central de las tres últimas ediciones. Barbara es responsable de coordinar la información que llega de capturistas, correctores, lectores de pruebas, ilustradores, editores gráficos, diseñadores y diagramadores, así como la oleada constante de cambios de texto ordenados por el autor. Siempre serena, organizada y meticulosa, se aseguró de que todo se hiciera correctamente. Hilary Newman y Anna Melhorn se encargaron de los programas de fotografías y dibujos de línea, respectivamente. He tenido una gran fortuna al poder trabajar con Hilary en las cinco ediciones de esta obra. Hilary es hábil y perseverante, y tengo toda la confianza en su capacidad para obtener cualquier imagen que se le solicite. También tuve un gran placer en trabajar con Anna por tercera ocasión. El libro tiene un programa de ilustraciones complejo y Anna llevó a cabo una soberbia labor en la coordinación de las muchas facetas necesarias para guiarlo hasta su terminación. El elegante diseño del libro se debe a los esfuerzos de Madelyn Lesure, cuyos talentos son evidentes. También me gustaría agradecer a los artistas de Imagineering por crear todas las nuevas ilustraciones, y a Heidi Bertignoll por su importante cometido de coordinar el programa de arte. Gracias asimismo a los profesores David Asai y Ken Robinson de la *Purdue University* por formular varias interesantes preguntas analíticas de los capítulos 2 a 5. Gracias a Stephen Reiss, quien manejó la mayor parte de las comunicaciones editoriales y en forma generosa me ayudó de muchas maneras durante el transcurso del proyecto. Gracias a Patrick Fitzgerald, quien fue el editor de biología al principio de esta revisión, y a Kevin Witt, quien le sucedió. Ambos dieron un gran apoyo a este proyecto. Un agradecimiento especial a Laura Ierardi y Gloria Hamilton, tan destacadas en sus profesiones. Laura distribuyó hábilmente las páginas de cada capítulo, y Gloria hizo un índice indentado. Estoy agradecido, en especial con Gloria por destinar tanto tiempo y esfuerzo adicionales para mejorar de manera notable la calidad del manuscrito.

Estoy agradecido de modo especial con los biólogos que suministraron las micrografías utilizadas en este libro; más que cualquier otro elemento, estas imágenes dan vida al estudio de la biología celular en la página impresa. Por último, deseo disculparme, por adelantado, por cualquier error del libro, y expreso mi sincero pesar. Agradezco la crítica constructiva y el consejo sano de los siguientes revisores:

Revisores de la quinta edición:

Karl Aufderheide
Texas A&M University

Ashok Bidwai
West Virginia University

Dennis O. Clegg
University of California—Santa Barbara

Ronald H. Cooper
University of California—Los Angeles

Susan DeSimone
Middlebury College

David Doe
Westfield State College

Arri Eisen
Emory University

Reginald Halaby
Montclair State University

Rebecca Heald
University of California—Berkeley

Marie Janicke
University at Buffalo—SUNY

Jeannette M. Loutsch
Arkansas State University

Margaret Lynch
Tufts University

Charles Mallery
University of Miami

Alan Nighorn
University of Arizona

James Patton
Vanderbilt University

Debra Pires
University of California—Los Angeles

Donna Ritch
University of Wisconsin—Green Bay

Harriett E. Smith-Somerville
University of Alabama

Adriana Stoica
Georgetown University

Colleen Talbot
California State Univerity, San Bernardino

Paul Twigg
University of Nebraska—Kearney

Jose Vazquez
New York University

Gary M. Wessel
Brown University

Eric V. Wong
University of Louisville

También debo seguir agradeciendo a los siguientes revisores de las dos ediciones previas:

Linda Amos
MRC Laboratory of Molecular Biology

Gerald T. Babcock
Michigan State University

William E. Balch
The Scripps Research Institute

James Barber
Imperial College of Science—Wolfson Laboratories

John D. Bell
Brigham Young University

Wendy A. Bickmore
Medical Research Council, United Kingdom

Daniel Branton
Harvard University

Thomas R. Breen
Southern Illinois University

Sharon K. Bullock
Virginia Commonwealth University

Roderick A. Capaldi
University of Oregon

Gordon G. Carmichael
University of Connecticut Health Center

Ratna Chakrabarti
University of Central Florida

K. H. Andy Choo
Royal Children's Hospitals—The Murdoch Institute

Orna Cohen-fix
National Institute of Health, Laboratory of Molecular and Cellular Biology

Philippa D. Darbre
University of Reading

Roger W. Davenport
University of Maryland

Barry J. Dickson
Research Institute of Molecular Pathology

Jennifer A. Doudna
Yale University

Michael Edidin
Johns Hopkins University

Evan E. Eichler
University of Washington

Robert Fillingame
University of Wisconsin Medical School

Jacek Gaertig
University of Georgia

Robert Helling
University of Michigan

Arthur Horwich
Yale University School of Medicine

Joel A. Huberman
Roswell Park Cancer Institute

Gregory D. D. Hurst
University College London

Ken Jacobson
University of North Carolina

Haig H. Kazazian, Jr.
University of Pennsylvania

Laura R. Keller
Florida State University

Nemat O. Keyhani
University of Florida

Nancy Kleckner
Harvard University

Werner Kühlbrandt
Max-Planck-Institut für Biophysik

James Lake
University of California—Los Angeles

Robert C. Liddington
Burnham Institute

Vishwanath R. Lingappa
University of California—San Francisco

Ardythe A. McCracken
University of Nevada—Reno

Thomas McKnight
Texas A&M University

Michelle Moritz
University of California—San Francisco

Andrew Newman
Cambridge University

Jonathan Nugent
University of London

Mike O'Donnell
Rockefeller University

Hugh R. B. Pelham
MRC Laboratory of Molecular Biology

Jonathan Pines
Wellcome/CRC Institute

Joel L. Rosenbaum
Yale University

Wolfram Saenger
Freie Universitat Berlin

Randy Schekman
University of California—Berkeley

Sandra Schmid
The Scripps Research Institute

Trina Schroer
Johns Hopkins University

David Schultz
University of Louisville

Jennifer W. Schuler
Wake Forest University

Rod Scott
Wheaton College

Katie Shannon
University of North Carolina—Chapel Hill

Joel B. Sheffield
Temple University

Dennis Shevlin
College of New Jersey

Bruce Stillman
Cold Springs Harbor Laboratory

Giselle Thibaudeau
Mississippi State University

Jeffrey L.Travis
University at Albany—SUNY

Nigel Unwin
MRC Laboratory of Molecular Biology

Ajit Varki
University of California—San Diego

Chris Watters
Middlebury College

Andrew Webber
Arizona State University

Beverly Wendland
Johns Hopkins University

Gary Yellen
Harvard Medical School

Masasuke Yoshida
Tokyo Institute of Technology

Robert A. Zimmerman
University of Massachusetts

Para el estudiante

En la época en que inicié la licenciatura, la biología figuraba en una lista de posibles materias relevantes. Me inscribí en un curso de antropología física para satisfacer el requerimiento académico por el camino más fácil posible. Durante ese curso conocí por primera vez los cromosomas, la mitosis y la recombinación genética y quedé fascinado por las intrincadas actividades que podían llevarse a cabo en el contorno tan pequeño del espacio celular. El semestre siguiente cursé una introducción a la biología y comencé a considerar con seriedad convertirme en un biólogo celular. Lo estoy abrumando con estas trivialidades personales a fin de que comprenda por qué escribí este libro y advertirle sobre las posibles repercusiones.

Aunque han transcurrido muchos años, todavía encuentro la biología celular como el tema más fascinante de explorar y aún paso el día leyendo sobre los últimos hallazgos realizados por colegas de la especialidad. Por estas razones, escribir un texto sobre biología celular representa para mí una razón y una oportunidad para mantenerme al tanto de lo que sucede en todo el campo. Mi objetivo principal al escribir este texto es ayudar a crear en los estudiantes una apreciación de las actividades en las que intervienen las moléculas gigantes y las estructuras minúsculas que habitan el mundo celular de la vida. Otro objetivo es proporcionar al lector una información sobre los tipos de preguntas que formulan los biólogos celulares y moleculares y las conductas experimentales que utilizan para hallar respuestas. A medida que lea el texto, piense como investigador, considere la prueba que se presenta, imagine explicaciones alternativas, planee experimentos que conduzcan a nuevas hipótesis.

Podría comenzar con una de las diversas micrografías electrónicas que llenan las páginas de este texto. Para tomar esta fotografía, imagínese sentado en una habitación pequeña, oscura como la boca de un lobo, enfrente de un gran instrumento metálico cuya columna se eleva varios metros sobre su cabeza. Observa a través de binoculares en una pantalla verde brillante y vívida. Las partes de la célula que examina aparecen oscuras e incoloras contra el fondo verde brillante. Son oscuras porque se tiñeron con átomos de metales pesados que desvían una fracción de los electrones dentro de un haz que se enfoca en la pantalla de observación mediante grandes lentes electromagnéticas en la pared de la columna. Los electrones que chocan con la pantalla se aceleran a través del espacio evacuado de la columna por una fuerza de decenas de miles de voltios. Una de sus manos puede tomar quizá la perilla que controla la potencia de amplificación de las lentes. Un giro simple de esta perilla puede cambiar la imagen, de un campo completo de células a una parte muy pequeña de ellas, como los ribosomas o una porción diminuta de una membrana aislada. Al girar otras perillas pueden observarse diferentes áreas del espécimen al pasar por la pantalla, lo que proporciona la sensación de conducir dentro de una célula. Una vez que se encuentra una estructura de interés, puede girarse la manivela que aparta la pantalla fuera de la vista, lo que hace posible que el haz de electrones golpee una pieza de la placa y produzca una imagen fotográfica del espécimen.

Debido a que el estudio de la función celular requiere el empleo de una instrumentación compleja, como el microscopio electrónico antes descrito, el investigador se aparta físicamente del tema que estudia. En más de un sentido, las células son como pequeñas cajas negras. Hemos desarrollado muchas formas para investigar las cajas, pero siempre andamos a tientas en un área que no es posible iluminar del todo. Se realiza un descubrimiento o se desarrolla una nueva técnica y penetra un nuevo haz de luz pequeño en la caja. Con un trabajo más profundo, se amplía la comprensión de la estructura o el proceso, pero siempre quedan preguntas adicionales. Se crean construcciones más completas y complejas, pero nunca podemos estar seguros de cuánto se aproximan las imágenes a la realidad. A este respecto, el estudio de la biología celular y molecular puede compararse con el estudio del elefante que llevan a cabo seis hombres ciegos en una antigua fábula india. Los seis viajan hacia un palacio cercano para conocer la naturaleza de los elefantes. Cuando llegan, cada uno se acerca al elefante y comienza a tocarlo. El primer hombre toca un costado del animal y concluye que un elefante es tan liso como una pared. El segundo toca el tronco y deduce que un elefante es cilíndrico como una serpiente. Los demás tocan el colmillo, la pierna, la oreja y la cola y cada uno se forma una impresión del animal a partir de sus experiencias personales limitadas. Los biólogos celulares están limitados en una forma similar cuando aplican una técnica o un método experimental particulares, aunque cada nueva pieza de información se añade a un cuerpo de conocimientos preexistentes para delinear un concepto mejor de la actividad bajo estudio, el cuadro total no deja de ser incierto.

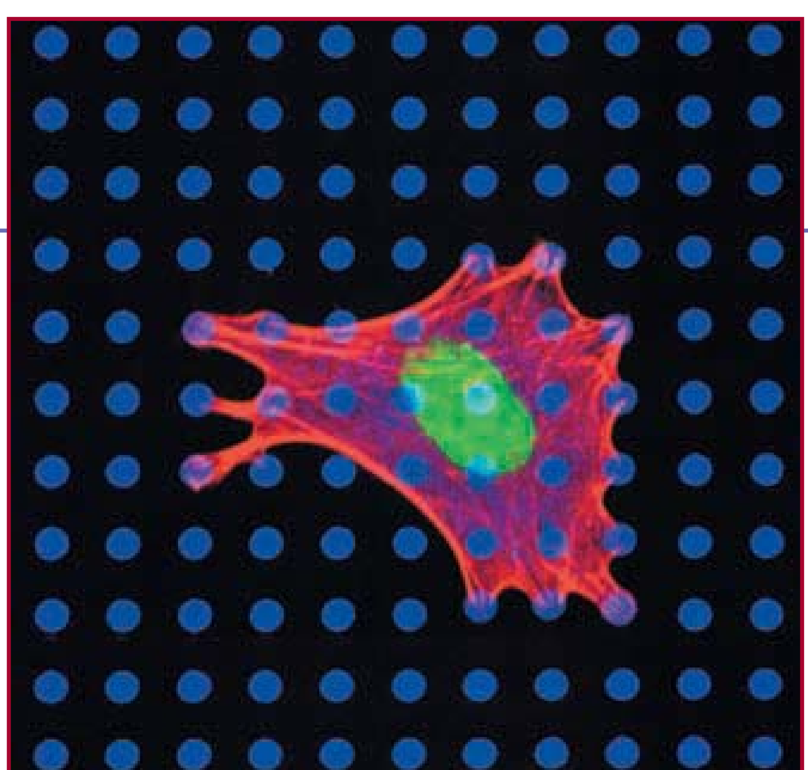
Antes de concluir estos comentarios introductorios, permítame tomarme la libertad de ofrecer al lector cierto consejo: no acepte como cierto todo lo que lea. Existen varias razones para recomendar tal escepticismo. Sin duda alguna, hay errores en el texto que reflejan la ignorancia e interpretación errónea del autor sobre ciertos aspectos de la bibliografía científica. Pero todavía más importante es considerar la naturaleza de la investigación biológica. La biología es una ciencia empírica; nada se ha comprobado alguna vez. Reunimos datos sobre un organelo particular de la célula, una reacción metabólica, el movimiento intracelular, etc., y hacemos cierto tipo de conclusiones. Algunas de ellas se apoyan en una prueba más sólida que otra. Incluso si existe un consenso sobre los "hechos" en cuanto a un fenómeno particular, con frecuencia se perfilan varias interpretaciones de los datos. Se plantean hipótesis y casi siempre estimulan una investigación más amplia, lo que lleva a una revaloración de la propuesta original. Casi todas las hipótesis que mantienen su validez se someten a cierta evolución y, cuando se presentan en el texto, no deben considerarse absolutamente correctas o incorrectas.

La biología celular es un campo que se mueve con rapidez y algunas de las mejores hipótesis suscitan en ocasiones una gran controversia. Aunque es un texto en el que se espera encontrar material bien estudiado, hay muchas partes en las que se presentan ideas nuevas, que a menudo se describen como modelos. Se han incluido estos modelos porque transmiten el pensamiento actual en el campo, incluso si se trata de modelos hipotéticos. Más aún, refuerzan la idea de que los biólogos celulares operan en la frontera de la ciencia, un área entre lo desconocido y lo conocido (o que se cree conocido). Permanezca escéptico.

Sinopsis del contenido

Contenido

CAPÍTULO 1



Introducción al estudio de la biología celular y molecular

Las células y sus estructuras son demasiado pequeñas para observarlas, escucharlas o tocarlas de manera directa. A pesar de esta enorme dificultad, las células son el tema de miles de publicaciones cada año y casi sin excepción cada aspecto de su minúscula estructura se encuentra bajo investigación. De muchas maneras, el estudio de la biología celular y molecular permanece como tributo a la curiosidad humana por investigar, descubrir, y a la inteligencia humana creativa para diseñar instrumentos complejos así como técnicas elaboradas gracias a las cuales se puedan realizar tales descubrimientos. Esto no implica que los biólogos celulares tengan el monopolio de estos nobles rasgos. En un extremo del espectro científico, los astrónomos buscan en los límites del universo agujeros negros y cuásares, cuyas propiedades parecen inimaginables cuando se comparan con las que existen en la Tierra. En el otro extremo, los físicos nucleares enfocan su atención en partículas de dimensiones subatómicas que también poseen propiedades inconcebibles. Desde luego, el universo posee mundos dentro de otros mundos; todos estos aspectos hacen fascinante su estudio.

Como se advierte a través de todo el libro, la biología celular y molecular es *reduccionista*, esto es, se basa en el razonamiento de que el conocimiento de las partes puede

Un ejemplo de la función de la innovación tecnológica en el campo de la biología celular. Esta micrografía de luz muestra una célula colocada sobre una "superficie" de postes sintéticos. Los postes flexibles sirven como sensores para medir la fuerza mecánica ejercida por la célula. Los elementos teñidos de rojo son haces de filamentos de actina intracelulares que generan fuerzas cuando existe movilidad celular. Cuando la célula se mueve deforma los postes a los cuales está unida y ello hace posible cuantificar la tensión que experimenta. El núcleo de la célula está teñido de verde. (Tomada de J. L. Tan, et al., Proc Nat'l Acad Sci USA 100(4), 2003; Cortesía de Christopher S. Chen, The Johns Hopkins University.)

explicar el carácter del todo. Visto de esta forma, la posición respecto de las maravillas y misterios de la vida puede reemplazarse por la necesidad de explicar todo en términos de los trabajos de la "maquinaria" de los sistemas vivientes. En la medida en que esto ocurra, se espera que dicha pérdida pueda sustituirse por una apreciación no menos importante de la belleza y complejidad de los mecanismos que encierra la actividad celular. ●

1.1 EL DESCUBRIMIENTO DE LAS CÉLULAS

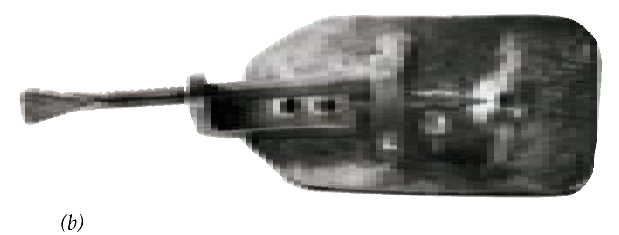
Debido a su tamaño pequeño, las células sólo pueden observarse con la ayuda de un **microscopio**, un instrumento que aumenta la imagen de un objeto diminuto. No se sabe cuándo los seres humanos descubrieron la capacidad de una superficie curva de vidrio para desviar la luz y formar imágenes. Los primeros espejuelos se produjeron en Europa en el siglo XIII y los primeros microscopios ópticos compuestos (de dos lentes) se construyeron a finales del siglo XVI. A mediados del siglo XVII, muchos científicos pioneros utilizaron sus microscopios caseros para descubrir un mundo que nunca se había revelado a simple vista. El descubrimiento de las células (fig. 1-1*a*) se acredita por lo general a Robert Hooke, un microscopista inglés que a la edad de 27 años le fue concedida la posición de curador de la *Royal Society of London*, la primera academia científica de Inglaterra. Una de las muchas preguntas que Hooke intentó resolver fue por qué los tapones de corcho (parte de la corteza de los árboles) eran tan adecuados para contener el aire en una botella. En 1665 escribió lo siguiente: "tomé un buen pedazo de corcho limpio y con un cuchillo tan afilado como una navaja de afeitar corté un pedazo y… entonces lo examiné con un *microscopio* y percibí que tenía una apariencia porosa… muy semejante a un panal de abejas". Hooke llamó a los poros *células* debido a que se asemejaban a las celdas habitadas por los monjes de un monasterio. En la actualidad se sabe que Hooke observó las paredes celulares vacías que corresponden al tejido vegetal muerto, es decir, paredes que en su origen elaboraron las células vivas circundantes.

Mientras tanto, Anton van Leeuwenhoek, un holandés que se ganaba la vida con la venta de ropa y botones, dedicaba su tiempo libre a tallar lentes y construir microscopios de gran calidad (fig. 1-1*b*). Durante 50 años, Leeuwenhoek envió cartas a la *Royal Society of London* en las que describió sus observaciones microscópicas, junto con una descripción incoherente de sus hábitos diarios y su estado de salud. Leeuwenhoek fue el primero en examinar una gota de agua estancada bajo el microscopio y para su asombro observó gran cantidad de "animalículos" en el campo del microscopio que iban y venían ante sus ojos. También fue el primero en describir diferentes formas de bacterias presentes en el agua resultante de remojar pimienta y en el material del raspado de sus dientes. Sus cartas iniciales remitidas a la *Royal Society*, en las que describe este mundo todavía no descubierto, se tomaron con tal escepticismo que la sociedad mandó a su curador Robert Hooke para confirmar las observaciones. Hooke hizo lo indicado y Leeuwenhoek se convirtió de inmediato en una celebridad mundial y recibió visitas en Holanda de Pedro el Grande de Rusia y la reina de Inglaterra.

No fue sino hasta la década de 1830 que se difundió la importancia de las células. En 1838, Matthias Schleiden, un abogado alemán que se convirtió en botánico, concluyó que a pesar de la diferencia en la estructura de varios tejidos, las plantas estaban hechas de células y que el embrión de la planta proviene de una sola célula. En 1839, Theodor Schwann, un zoólogo alemán y colega de Schleiden, publicó un informe detallado sobre las bases celulares del mundo animal. Schwann concluyó que las células de plantas y animales son estructuras similares y propuso estos dos principios de la **teoría celular**:

- Todos los organismos están compuestos de una o más células.
- La célula es la unidad estructural de la vida.

(a)



(b)

FIGURA 1-1 El descubrimiento de las células. *a*) Uno de los microscopios compuestos (con doble lente) más vistosos de Robert Hooke. Inserto, dibujo realizado por Hooke de un corte delgado de corcho que muestra una red de "células" parecida a un panal de abejas. *b*) Microscopio de una sola lente usado por Anton van Leeuwenhoek para observar bacterias y otros microorganismos. Las lentes biconvexas, capaces de aumentar el tamaño de un objeto en cerca de 270 veces y proveer una resolución cercana a 1.35 μm, estaban sostenidas entre dos placas metálicas. (TOMADA DE THE GRANGER COLLECTION; INSERTO Y FIGURA 1-1*B*, TOMADOS DE CORBIS BETTMANN.)

Las ideas de Schleiden y Schwann sobre el *origen* de las células son menos profundas; ambos están de acuerdo en que éstas podrían originarse de materiales acelulares. Dada la importancia que tuvieron estos dos investigadores en el mundo científico, fue necesario que pasaran muchos años para que las observaciones de otros biólogos, respecto de que las células no se forman por generación espontánea, se aceptaran. Para 1855, el patólogo alemán Rudolf Virchow había formulado un argumento convincente para el tercer postulado de la teoría celular:

- Las células sólo pueden originarse por división de una célula preexistente.

1.2 PROPIEDADES BÁSICAS DE LAS CÉLULAS

Las células, así como las plantas y los animales, tienen vida. En realidad, la vida es la propiedad básica de las células y éstas son las unidades más pequeñas que poseen tal naturaleza. A diferencia de las partes de una célula, las cuales se deterioran si se encuentran aisladas, las células completas pueden obtenerse de una planta o animal y cultivarse en un laboratorio donde se multiplican y crecen durante periodos largos. Si no se las trata de modo adecuado pueden morir. La muerte puede considerarse una de las propiedades básicas de la vida porque sólo una entidad viva enfrenta esta perspectiva. Resulta importante señalar que las células dentro del cuerpo mueren casi siempre "por su propia mano", es decir, son víctimas de un programa interno por el cual las células innecesarias o aquellas que tienen el riesgo de tornarse malignas se eliminan a sí mismas.

En 1951, George Gey de la *Johns Hopkins University* realizó el primer cultivo de células humanas. Las células se obtuvieron de un tumor maligno que provenía de Henrietta Lacks y, por lo tanto, se denominaron células HeLa. Las células HeLa, descendientes por división celular de esta primera muestra de células, continúan creciendo en la actualidad en diferentes laboratorios del mundo (fig. 1-2). Como estas células son más fáciles de estudiar que las que se hallan dentro del cuerpo, las células crecidas **in vitro** (p. ej., en un cultivo fuera del organismo) se han convertido en una herramienta esencial para los biólogos celulares y moleculares. De hecho, mucha de la información que se discute en este libro se obtuvo de células crecidas en cultivos de laboratorio.

FIGURA 1-2 **Las células HeLa**, como las que se muestran, fueron las primeras células humanas mantenidas en cultivo por largos periodos y aún se utilizan. A diferencia de las células normales que en cultivo tienen un tiempo de vida finito, las células HeLa cancerosas pueden cultivarse de forma indefinida si las condiciones son favorables para mantener el crecimiento y división celulares. Esta micrografía electrónica de barrido (sección 18.1) se coloreó para resaltar el contraste. (Keith Porter/Photo Researchers.)

La micrografía mostrada en la figura 1-2 se tomó con un microscopio de alto poder llamado *microscopio electrónico de barrido*, que permite a los investigadores examinar los detalles de la superficie de las células. Como se analiza en el capítulo 18, los microscopios electrónicos emplean un haz enfocado de electrones que provee una imagen muy detallada de la célula y sus partes. Otro tipo de microscopio electrónico, el *microscopio electrónico de transmisión*, se usa para revelar con detalle la estructura interna de las células (como en la figura 1-10). Las micrografías del microscopio electrónico de transmisión tomadas a principios de la década de 1950 mostraron a los investigadores un primer vistazo de la intrincada estructura que permanece oculta en los límites de una pequeña célula.

La exploración de la célula comienza con el análisis de algunas de sus propiedades fundamentales.

Las células son muy complejas y organizadas

La complejidad es una propiedad que es evidente pero difícil de describir. En este momento es posible pensar sobre la complejidad en términos de orden y consistencia. Cuanto más compleja sea una estructura, mayor es el número de partes que deben estar en el lugar adecuado, menor la tolerancia a errores en la naturaleza e interacciones de las partes y mayor la regulación o control que se debe ejercer para mantener el sistema.

Las actividades celulares pueden ser extremadamente precisas. Por ejemplo, la duplicación del DNA (ácido desoxirribonucleico) se realiza con una tasa de error inferior a un error por cada diez millones de nucleótidos incorporados, y la mayoría de tales errores se corrigen con rapidez por un intrincado mecanismo de reparación que reconoce el defecto.

A lo largo de este libro se considera la complejidad de la vida en diferentes niveles. Se describen la organización de átomos dentro de moléculas pequeñas, la disposición de estas moléculas dentro de polímeros gigantes y el arreglo de moléculas poliméricas en complejos, los cuales a su vez están dispuestos dentro de organelos subcelulares y al final en el interior de células. Como se observa, existe una gran consistencia en todos los niveles. Cada tipo celular posee una apariencia constante bajo el microscopio electrónico; esto es, los organelos tienen una forma y localización particulares, en individuos de diferentes especies. De manera semejante, cada tipo de organelo muestra una composición constante de macromoléculas que están ordenadas en un patrón predecible. Considérese a las células que se encuentran en el intestino y que se encargan de obtener los nutrimentos del tubo digestivo (fig. 1-3).

Las células epiteliales que limitan el intestino están unidas estrechamente y semejan los ladrillos de una pared. Los extremos apicales de estas células, cuya cara da a la luz intestinal, tienen elongaciones (*microvellosidades*) que facilitan la absorción de nutrimentos. Las microvellosidades son capaces de proyectarse fuera de la superficie celular apical debido a que contienen un esqueleto interno formado por filamentos, los cuales a su vez están compuestos de monómeros de proteína (*actina*) polimeri-

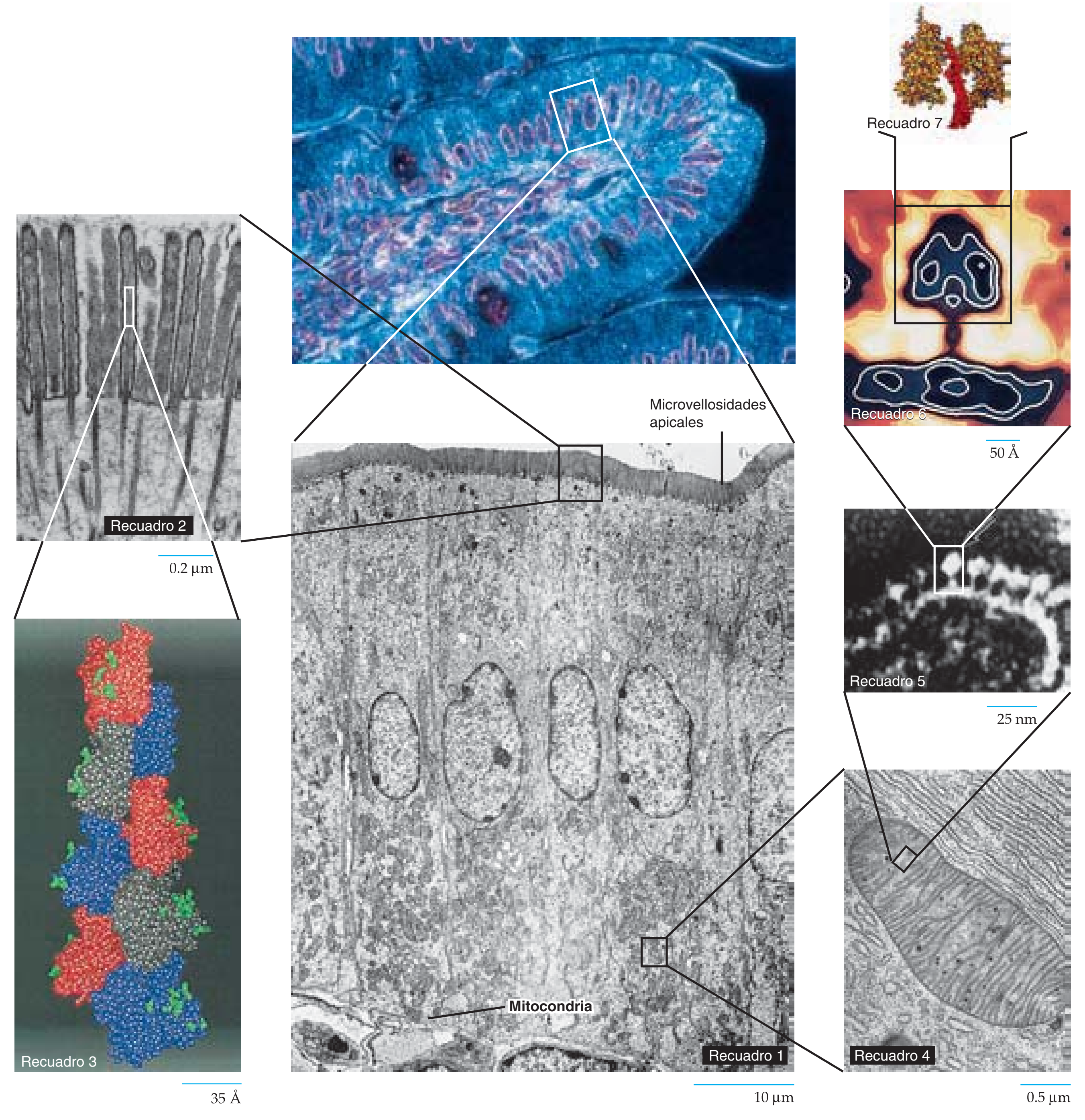


FIGURA 1-3 Niveles de organización celular y molecular. La fotografía en colores brillantes de una sección teñida muestra la estructura microscópica de una vellosidad de la mucosa del intestino delgado, como se observa a través del microscopio óptico. El recuadro 1 representa una micrografía electrónica de la capa epitelial de células que limitan la pared interior del intestino. La superficie apical de cada célula que mira hacia la luz intestinal tiene un gran número de microvellosidades que intervienen en la absorción de nutrimentos. La región basal de cada célula contiene un gran número de mitocondrias en las que la energía se mantiene disponible para las actividades celulares. El recuadro 2 muestra las microvellosidades apicales; cada microvellosidad contiene un haz de microfilamentos. El recuadro 3 representa las subunidades de la proteína actina que forman parte de cada filamento. En el recuadro 4 se distingue una mitocondria similar a la encontrada en la región basal de las células epiteliales. El recuadro 5 señala una porción de la membrana interna de las mitocondrias, incluidas las partículas pediculadas (flecha superior) que se proyectan a partir de la membrana y corresponden a los sitios donde se sintetiza el ATP. Los recuadros 6 y 7 muestran los modelos moleculares de la maquinaria de síntesis de ATP, la cual se describe por completo en el capítulo 5. (Micrografía de luz, Cecil Fox/Photo Researchers; recuadro 1, cortesía de Shakti P. Kapur, Georgetown University Medical Center; recuadro 2, cortesía de Mark S. Mooseker y Lewis G. Tilney, J Cell Biol. 67:729, 1975, con autorización de la Rockefeller University Press; recuadro 3, cortesía de Kenneth C. Holmes; recuadro 4, cortesía de Keith R. Porter/Photo Researchers; recuadro 5, cortesía de Humberto Fernandez-Moran; recuadro 6, cortesía de Roderick A. Capaldi; recuadro 7, cortesía de Wolfgang Junge, Holger Lill y Siegfried Engelbrecht, Universidad de Osnabrück, Alemania.)

zados en una disposición característica. En su extremo basal, las células intestinales poseen gran cantidad de mitocondrias que proveen la energía requerida para alimentar varios procesos de transporte de membrana. Cada mitocondria se compone de un patrón definido de membranas internas, las cuales a su vez están compuestas por un arreglo proteico, que incluye una fábrica de ATP (trifosfato de adenosina) que funciona con electricidad, ésta se proyecta desde la membrana interna y parece una pelota en el extremo de una barra. Cada uno de estos niveles de organización se ilustra en los recuadros de la figura 1-3.

Por fortuna para los biólogos celulares y moleculares, la evolución avanza con lentitud en los niveles de la organización biológica que les interesa. Por ejemplo, mientras que un ser humano y un gato tienen características anatómicas muy diferentes, las células que conforman sus tejidos y los organelos que integran sus células son semejantes. El filamento de actina el cual se representa en la figura 1-3, recuadro 3, y la enzima sintasa de ATP que se observa en el recuadro 6, son idénticos a las estructuras encontradas en diferentes organismos, como seres humanos, caracoles, levaduras y secuoyas. La información obtenida del estudio de las células de un tipo de organismo tiene a menudo aplicaciones directas en otras formas de vida. Muchos de los procesos más elementales, como la síntesis de proteínas, la conversión de energía química o la construcción de una membrana, son muy parecidos en todos los organismos.

Las células poseen un programa genético y los medios para usarlo

Los organismos están construidos de acuerdo con la información codificada en un grupo de genes. El programa genético humano contiene suficiente información para llenar millones de páginas de un texto, si se codificara en palabras. Resulta relevante que esta gran cantidad de información está empaquetada dentro de un grupo de cromosomas que ocupan el espacio del núcleo celular: cientos de veces más pequeño que el punto de esta *i*.

Los genes son más que gavetas para almacenar información: constituyen los planos para construir las estructuras celulares, las instrucciones para llevar a cabo las actividades celulares y el programa para duplicarse. La estructura molecular de los genes permite, mediante cambios en la información genética (mutaciones), que exista variación entre individuos, lo cual forma la base de la evolución biológica. El descubrimiento de los mecanismos por los cuales las células usan su información genética es uno de los logros más grandes de la ciencia en las últimas décadas.

Las células son capaces de reproducirse

Las células, al igual que otros organismos, se generan por reproducción. Las células se reproducen por división, un proceso en el cual el contenido de una célula "madre" se distribuye dentro de dos células "hijas". Antes de la división, el material genético se duplica con éxito y cada célula hija comparte la misma información genética. En la mayoría de los casos, las dos células hijas tienen el mismo volumen. Sin embargo, en algunos casos, como ocurre cuando un oocito humano sufre división, una de las células retiene casi todo el citoplasma, aunque ésta reciba sólo la mitad del material genético (fig. 1-4).

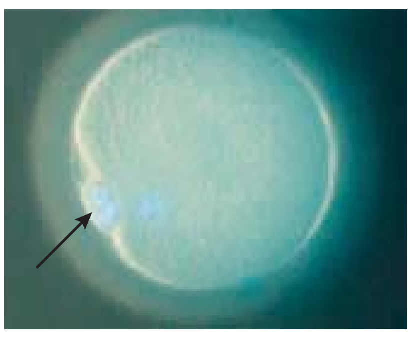


FIGURA 1-4 Reproducción celular. Este oocito de mamífero experimentó de forma reciente una división celular muy desigual en la cual la mayor parte del citoplasma se retuvo dentro del gran oocito, que tiene el potencial para fecundarse y desarrollar un embrión. La otra célula es un remanente no funcional que consiste casi en su totalidad de material nuclear (se indica por los cromosomas teñidos de azul, flecha). (CORTESÍA DE JONATHAN VAN BLERKOM.)

Las células obtienen y utilizan energía

El desarrollo y mantenimiento de la complejidad exigen la constante entrada de energía (fig. 1-5). Virtualmente, toda la energía necesaria para la vida en la superficie de la Tierra proviene de la radiación electromagnética del sol. Esta energía es captada por los pigmentos que absorben luz presentes en las membranas de las células fotosintéticas. La energía luminosa se convierte por fotosíntesis en energía química, que se almacena en carbohidratos ricos en energía, como almidón y sacarosa. Para la mayoría de las células animales, la energía llega a menudo preempacada en forma de glucosa. En las personas, la glucosa pasa a través del hígado hacia la sangre, que circula a través del cuerpo y libera energía química en todas las células. Una vez dentro de la célula, la glucosa se desensambla de tal manera que su contenido energético se puede almacenar en forma de energía disponible con rapidez (por lo general como ATP), que más tarde se utiliza para el funcionamiento de las innumerables actividades celulares que requieren energía. Las células invierten una enorme cantidad de energía simplemente en degradar y reconstruir las

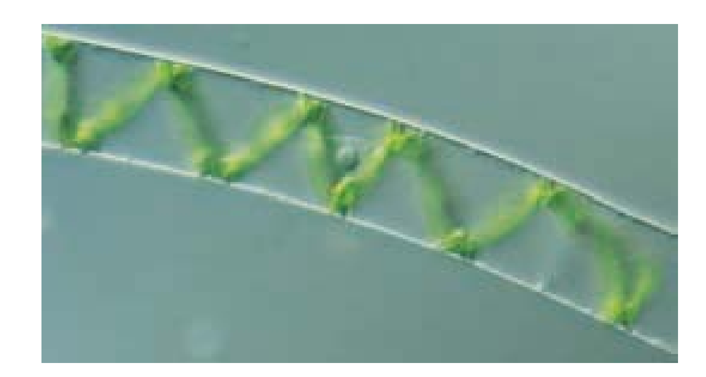


FIGURA 1-5 Captación de energía. Una célula viva del alga filamentosa *Spirogyra.* El cloroplasto es semejante a un listón, el cual se observa en zigzag a través de la célula y es el sitio donde se captura la energía de la luz solar y se convierte en energía química durante la fotosíntesis. (M.I. WALKER/PHOTO RESEARCHERS.)

macromoléculas y los organelos de los que están hechas. Este continuo "recambio", como se le llama, mantiene la integridad de los componentes celulares en virtud de los inevitables procesos de desgaste y rotura, y permite a la célula reaccionar con rapidez a las condiciones cambiantes.

Las células llevan a cabo diferentes reacciones químicas

La función celular se asemeja a plantas químicas en miniatura. Aunque la célula bacteriana más simple es capaz de realizar cientos de transformaciones químicas diferentes, ninguna de ellas ocurre a una velocidad significativa en el mundo inanimado. Por lo general, todos los cambios químicos que se efectúan en las células necesitan *enzimas*, moléculas que incrementan el ritmo al que tiene lugar una reacción química. La suma total de las reacciones químicas en una célula representa el **metabolismo** celular.

Las células se ocupan de numerosas actividades mecánicas

Las células son sitios de mucha actividad. Los materiales se transportan de un lugar a otro, las estructuras se acoplan y desacoplan con rapidez y, en muchos casos, la célula entera se mueve por sí misma de un punto a otro. Estos tipos de actividades se basan en cambios mecánicos y dinámicos intracelulares, la mayoría de ellos iniciados por cambios en la estructura proteínica "motora". Las proteínas motoras son sólo uno de los muchos tipos de "máquinas" moleculares empleadas por la célula para llevar a cabo actividades mecánicas.

Las células son capaces de reaccionar a estímulos

Algunas células responden a estímulos de manera obvia; por ejemplo, un protista unicelular se mueve lejos de un objeto que está en su camino o se dirige hacia una fuente de nutrimentos. Las células que conforman una planta o animal multicelulares no reaccionan a estímulos de modo tan obvio. La mayor parte de las células está cubierta de *receptores* que interaccionan con sustancias en el ambiente en una forma muy específica. Las células poseen receptores para hormonas, factores de crecimiento, materiales extracelulares, así como sustancias localizadas en la superficie de otras células. Los receptores de las células proveen las vías a través de las cuales los agentes externos pueden iniciar reacciones específicas en la célula blanco. Las células pueden responder a estímulos específicos por medio de la alteración de sus actividades metabólicas, al prepararse para la división celular, moverse de un lugar a otro o aniquilándose a sí mismas.

Las células son capaces de autorregularse

Además de requerir energía, el mantenimiento de un estado complejo y ordenado exige regulación constante. La importancia de los mecanismos de regulación celular es más evidente cuando las células se dañan. Por ejemplo, la falla de una célula para corregir un error cuando duplica su DNA puede crear una mutación que la debilita, o una alteración en el control de crecimiento de la célula, que puede transformar a la célula en una célula cancerosa con la capacidad para destruir a todo el organismo. Poco a poco se conoce más acerca de la forma en que la célula controla estas actividades, pero falta mucho más por descubrir.

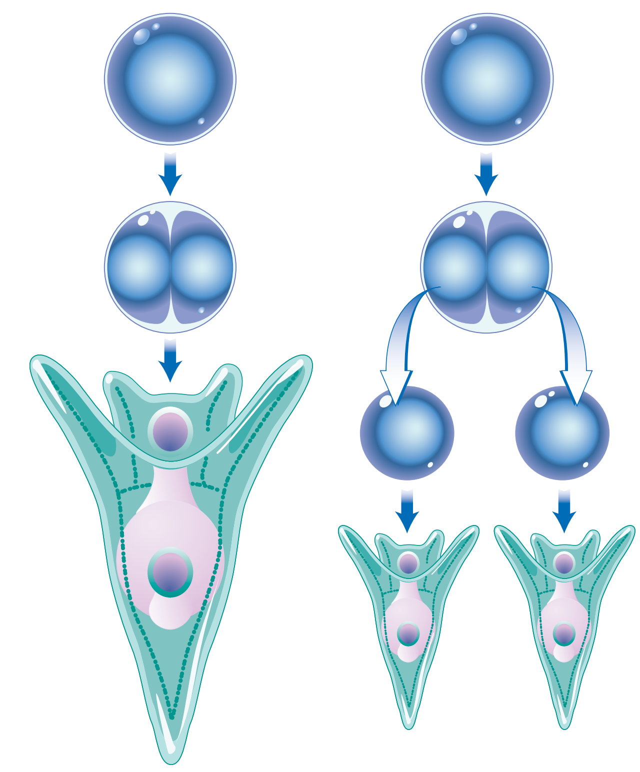
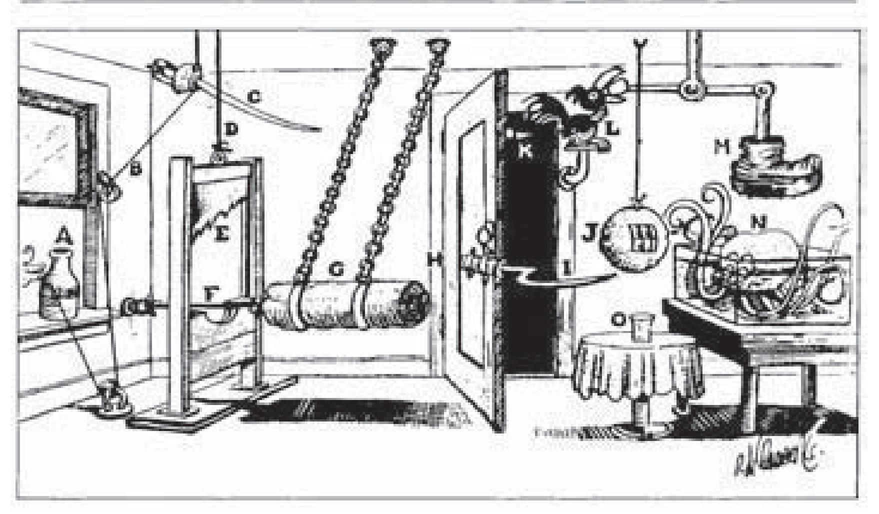


FIGURA 1-6 Autorregulación. El esquema de la izquierda muestra el desarrollo normal de un erizo de mar en el cual un huevo fecundado da lugar a un solo embrión. El esquema de la derecha señala un experimento en el que las células de un embrión se separan después de la primera división y se permite que cada célula se desarrolle de manera aislada. En lugar de desarrollarse la mitad de un embrión, como ocurriría si no se alterara, cada célula aislada reconoce la ausencia de su vecina y regula su desarrollo para formar un embrión completo (aunque más pequeño).

Considere el siguiente experimento que llevó a cabo en 1891 Hans Driesch, un embriólogo alemán. Driesch encontró que podía separar por completo las primeras dos o cuatro células de un embrión de erizo de mar y que cada una de las células aisladas desarrollaba un embrión normal (fig. 1-6). ¿Cómo puede una célula que por lo general está destinada a formar sólo una parte del embrión regular sus propias actividades y formar un embrión entero?, ¿de qué forma la célula aislada reconoce la ausencia de sus vecinas y reorienta el curso de su desarrollo celular?, ¿cómo puede una parte del embrión tener un sentido del todo? Hasta el momento no es posible mejorar las respuestas que se dieron hace más de 100 años, cuando se efectuó este experimento.

En este libro se describen procesos que requieren diversos pasos ordenados, muchos de los cuales son parecidos a las líneas de ensamble en el armado de un automóvil, donde los trabajadores acoplan, remueven o hacen ajustes específicos conforme el armado del auto avanza. En la célula, la información para el diseño de productos reside en los ácidos nucleicos y los trabajadores de la construcción son sobre todo las proteínas. Más que ningún otro factor, la presencia de estos dos tipos de macromoléculas aparta a la química celular del mundo inerte. En la célula, los trabajadores tienen que actuar sin el beneficio de



El profesor Butts cayó por el foso abierto de un elevador y cuando tocó tierra sólo encontró una máquina para exprimir naranjas. El lechero toma la botella de leche vacía (A) y jala de la cuerda (B), lo que provoca que la espada (C) corte la cuerda (D). Esto permite que la navaja de la guillotina (E) caiga y corte la cuerda (F), que a su vez libera el ariete (G). El ariete empuja la puerta abierta (H) y la cierra. La hoz (I) corta la naranja (J) y, al mismo tiempo, la espina (K) lastima al "halcón" (L). Este último abre el pico por el dolor y suelta la ciruela y permite que el zapato (M) caiga sobre la cabeza de un pulpo dormido (N). El pulpo despierta molesto y observa la cara del buzo dibujada sobre la naranja y la oprime; de esa manera el jugo de naranja cae al vaso (O).

Después puede utilizarse el tronco para construir una cabaña en la que puede crecer su hijo, que llegará a ser presidente como Abraham Lincoln.

FIGURA 1-7 **Las actividades celulares** con frecuencia son análogas a esta máquina de Rube Goldberg en la cual un suceso activa "de manera automática" a otro posterior, en una secuencia de reacciones. (RUBE GOLDBERG™ Y © DE RUBE GOLDBERG, INC.)

la dirección consciente. Cada paso de un proceso debe ocurrir de modo espontáneo, de tal forma que el siguiente se active de manera automática. En muchos sentidos, la célula opera de un modo análogo al artilugio para exprimir una naranja, descubierto por "el profesor" y que se muestra en la figura 1-7. Cada tipo de actividad celular necesita un grupo único de herramientas moleculares muy complejas y máquinas: los productos de los periodos de la selección natural y su evolución. El objetivo más importante de los biólogos celulares y moleculares es entender la estructura molecular y la función de cada uno de los componentes que intervienen en una actividad particular, así como los medios por los cuales estos componentes interactúan y los mecanismos que regulan dichas interacciones.

Las células evolucionan

¿Cómo surgieron las células? De todas las preguntas trascendentes formuladas por los biólogos, ésta es la que menos respuestas tiene. Se piensa que las células proceden de algunas formas de vida precelular, las cuales a su vez se originaron de materiales orgánicos sin vida que estuvieron presentes en los océanos primordiales. Sin embargo, el origen de las células está envuelto en un misterio total; la evolución de las células puede estudiarse por medio del análisis de los organismos vivos de la actualidad. Si se observan las características de las células bacterianas que viven en el tubo digestivo de los seres humanos (véase fig. 1-18*a*) y una célula que forma parte de la pared del intestino (fig. 1-3); son notorias las diferencias que existen entre estas dos células. No obstante, proceden de una célula ancestral común que vivió hace más de tres mil millones de años. Estas estructuras que comparten las dos células relacionadas de forma distante, como su membrana celular y los ribosomas, debieron estar en la célula ancestral. Se examinan algunos sucesos ocurridos durante la evolución de las células en la sección Vías experimentales al final del capítulo. Es preciso tener en mente que la evolución no es tan sólo un hecho del pasado, sino un proceso dinámico que aún modifica las propiedades de las células de los organismos que todavía no han aparecido.

REVISIÓN

1. Liste las propiedades fundamentales que comparten todas las células. Describa la importancia de cada una de estas propiedades.
2. Describa algunas de las características celulares que sugieran que todos los organismos vivos derivan de un ancestro común.
3. ¿Cuál es la fuente de energía que mantiene la vida en la Tierra?, ¿cómo se transfiere esta energía de un organismo a otro?

1.3 DOS CLASES DE CÉLULAS FUNDAMENTALMENTE DIFERENTES

Una vez que el microscopio electrónico estuvo disponible, los biólogos fueron capaces de examinar la estructura interna de una gran variedad de células. A partir de estos estudios se encontró que existen dos tipos básicos de células (procariotas y

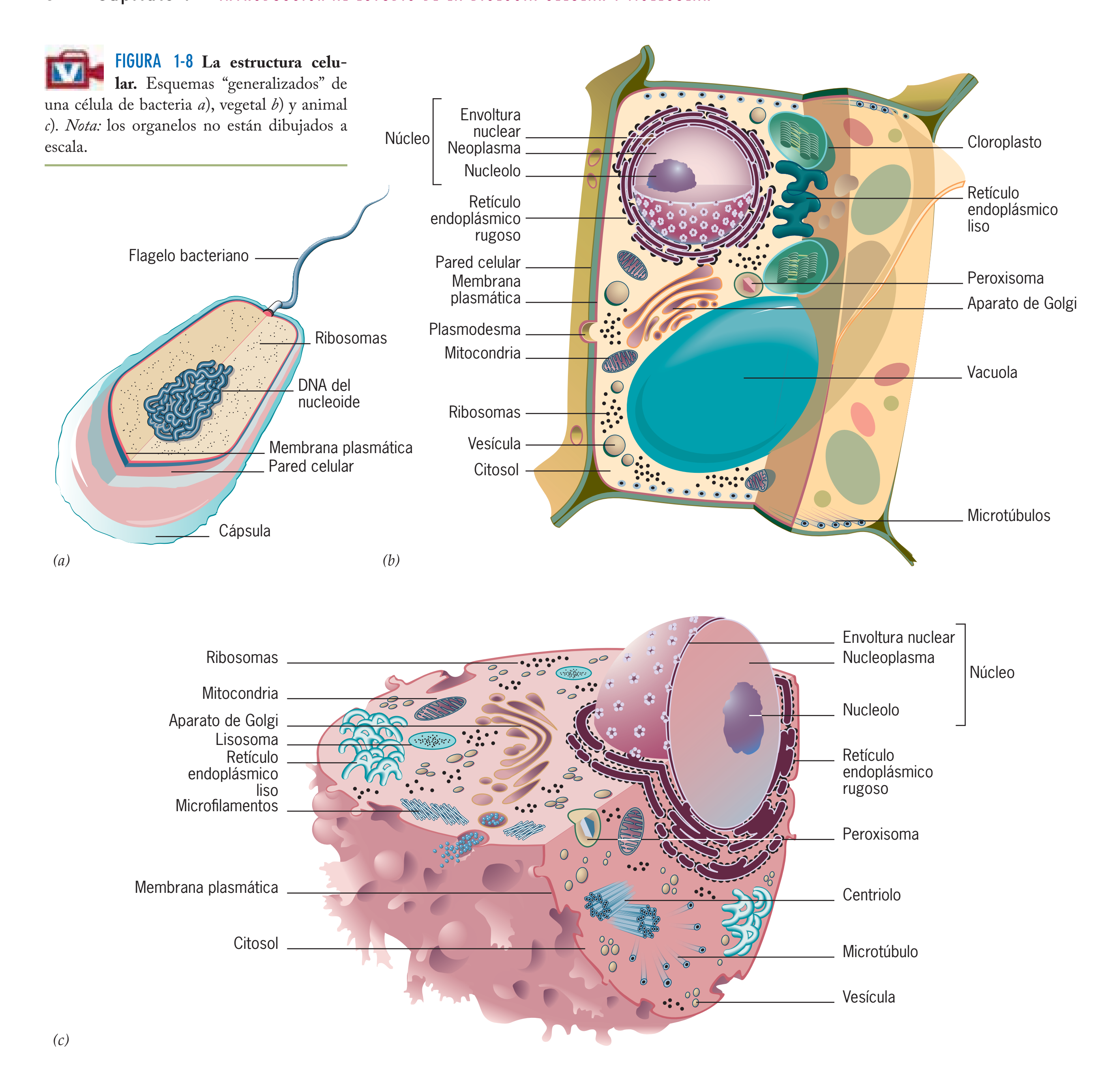


FIGURA 1-8 La estructura celular. Esquemas "generalizados" de una célula de bacteria *a*), vegetal *b*) y animal *c*). *Nota:* los organelos no están dibujados a escala.

eucariotas) que se diferencian por su tamaño y tipos de estructuras internas u **organelos** (fig. 1-8). La existencia de dos clases distintas de células sin ningún intermediario conocido representa una de las divisiones evolutivas más importantes en el mundo biológico. Las células **procariotas**, que en su estructura son más simples, incluyen a las bacterias, mientras que las células **eucariotas** tienen una estructura más compleja e incluyen a los protistas, hongos, plantas y animales.[1]

No se sabe con certeza cuándo aparecieron las células por primera vez en la Tierra. Hay evidencias, obtenidas de fósiles de que la vida procariota existe desde hace unos 2 700 millones de años. Estas rocas no contienen tan sólo microbios fosilizados, sino también moléculas orgánicas complejas que son características de tipos particulares de organismos procariotas, incluidas las cianobacterias. Es improbable que tales moléculas se sintetizaran de manera abiótica, esto es, sin la participación de células vivas. El comienzo de las células eucariotas también está rodeado de incertidumbre. Los animales complejos aparecieron de forma más repentina en los registros fósiles hace unos 600 millones de años, pero hay muchas evidencias de que los organismos eucariotas más simples estuvieron presentes en la Tierra desde más de 1 000 millones de años antes. El tiempo estimado de la aparición sobre la Tierra de algunos de los principales grupos de organismos se consigna en la figura 1-9. Una vista

[1] El lector interesado en examinar una propuesta para acabar con el concepto antagónico de organismos procariotas y eucariotas puede leer un breve ensayo de N. R. Pace en *Nature* 441:289, 2006.

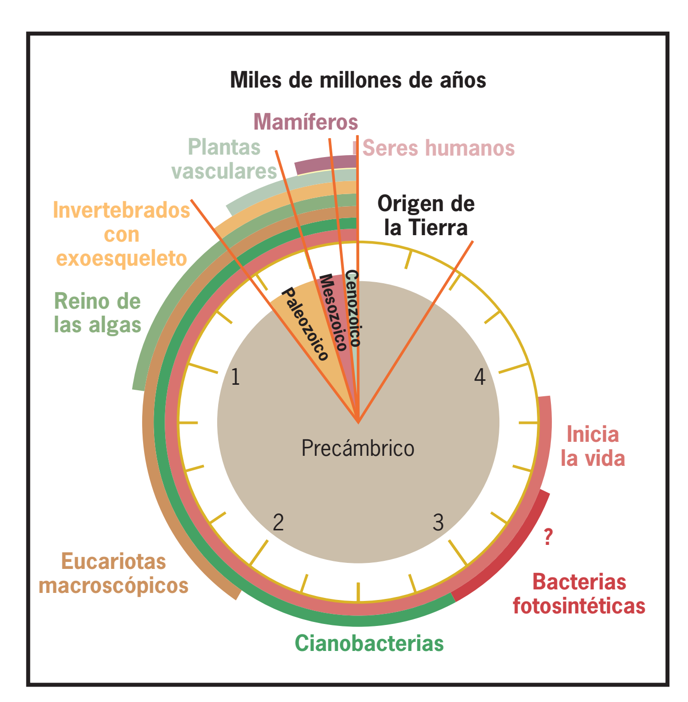


FIGURA 1-9 **Reloj biogeológico de la Tierra.** Esquema de los cinco mil millones de años de la historia del planeta que muestra el tiempo de aparición de los principales grupos de organismos. Los animales complejos (invertebrados) y las plantas vasculares aparecieron relativamente en periodos recientes. El tiempo indicado para el origen de la vida está sujeto a conjetura. Además, las bacterias fotosintéticas pudieron aparecer de manera más temprana y por tanto permanece la interrogante. Las eras geológicas se indican en el centro de la ilustración. (Reimpresa con autorización de D. J. Des Marais, Science 289:1704, 2001. Copyright © 2001 American Association for the Advancement of Science.)

superficial de esta figura revela la manera en que la vida apareció "pronto" después de la formación de la Tierra y el enfriamiento de su superficie, así como el tiempo que tomó la subsecuente evolución de los animales complejos y plantas.

Características que diferencian a las células procariotas de las eucariotas

La siguiente es una breve comparación entre células procariotas y eucariotas que hace evidentes muchas diferencias básicas entre los dos tipos, así como bastantes similitudes (véase fig. 1-8). Las semejanzas y diferencias entre los dos tipos de células se muestran en el cuadro 1-1. Las propiedades que comparten reflejan que las células eucariotas casi con certeza evolucionaron a partir de ancestros procariotas. A causa de su ancestro común, ambos tipos de células poseen un lenguaje genético idéntico, un grupo común de vías metabólicas y muchas propiedades estructurales afines. Por ejemplo, los dos tipos celulares están limitados por membranas plasmáticas de estructura semejante que sirven como una barrera de permeabilidad selectiva entre los mundos vivo e inerte. Ambos tipos de células pueden estar recubiertos por una *pared celular* rígida y sin vida que protege la delicada vida de su interior. Aunque las paredes celulares de procariotas y eucariotas pueden tener funciones semejantes, su composición química es muy diferente.

En su interior, las células eucariotas son mucho más complejas (en estructura y función) que las células procariotas (fig. 1-8). La diferencia en complejidad estructural es evidente en las micrografías electrónicas de una célula bacteriana y una animal que se muestran en las figuras 1-18*a* y 1-10, de manera respectiva. Ambas contienen una región nuclear, la cual posee el material genético de la célula rodeado por citoplasma. El material genético de la célula procariota está presente en un **nucleoide**: una región de la célula no bien definida, sin membrana, que lo separa del citoplasma circundante. En cambio, las

Cuadro 1-1 Comparación entre células procariotas y eucariotas

Características comunes:

- Membrana plasmática de estructura similar
- Información genética codificada en el DNA mediante códigos genéticos idénticos
- Mecanismos similares para la transcripción y traducción de la información genética, incluidos ribosomas semejantes
- Rutas metabólicas compartidas (p. ej., glucólisis y ciclo de los ácidos tricarboxílicos [TCA])
- Aparato similar para la conservación de la energía química en forma de ATP (localizado en la membrana plasmática de procariotas y en la membrana mitocondrial de eucariotas)
- Mecanismos semejantes para la fotosíntesis (entre cianobacterias y plantas verdes)
- Mecanismos parecidos para sintetizar e insertar las proteínas de membrana
- Estructura similar (entre arqueobacterias y eucariotas) de proteosomas (estructuras para la digestión de proteínas)

Características de las células eucariotas que no se encuentran en procariotas:

- División de la célula en núcleo y citoplasma, separados por una envoltura nuclear que contiene estructuras complejas de poros
- Los cromosomas son complejos y están compuestos por DNA y proteínas relacionadas capaces de compactarse en estructuras mitóticas
- Organelos citoplásmicos membranosos complejos (incluidos el retículo endoplásmico, aparato de Golgi, lisosomas, endosomas, peroxisomas y glioxisomas)
- Organelos citoplásmicos especializados para la respiración aerobia (mitocondrias) y fotosíntesis (cloroplastos)
- Un sistema complejo de citoesqueleto (incluidos microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos)
- Cilios y flagelos complejos
- Son capaces de ingerir materiales líquidos y sólidos y atraparlos dentro de vesículas membranosas plasmáticas (endocitosis y fagocitosis)
- Paredes celulares (en plantas) que contienen celulosa
- La división celular utiliza un huso mitótico que contiene microtúbulos para separar cromosomas
- Presencia de dos copias de genes por célula (diploidía), un gen que proviene de cada padre
- Presencia de tres enzimas diferentes para sintetizar RNA (polimerasas de RNA)
- Reproducción sexual que requiere meiosis y fecundación

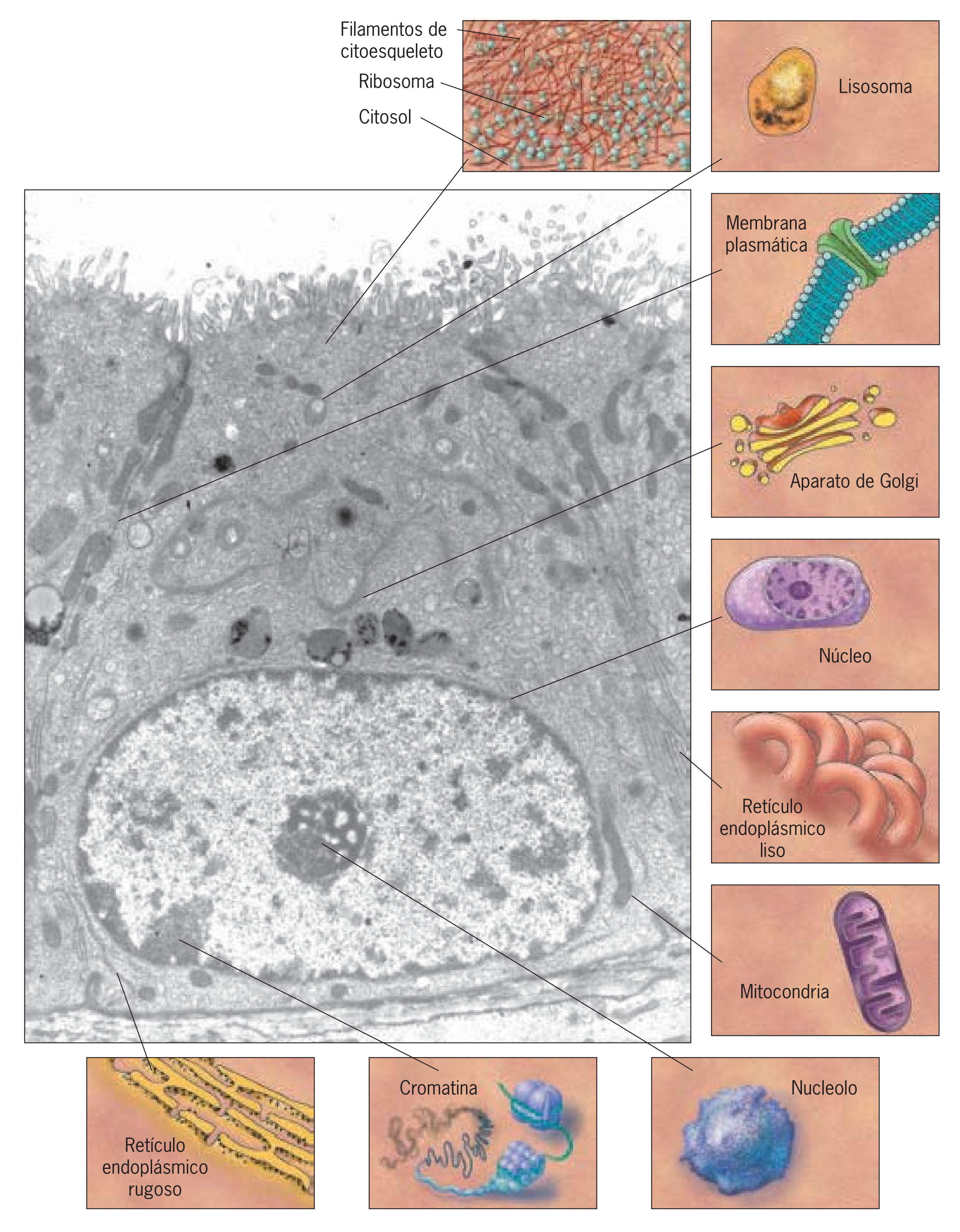


FIGURA 1-10 **La estructura de una célula eucariota.** Esta célula epitelial limita el conducto reproductivo en la rata macho. En los diagramas esquemáticos, alrededor de la figura principal, se indican y muestran algunos organelos diferentes. (David Phillips/Visuals Unlimited.)

células eucariotas poseen un **núcleo**: una región separada por una estructura membranosa compleja llamada *envoltura nuclear*. Esta diferencia de la estructura nuclear es la base de los términos *procariota* (*pro*, antes; *karyon*, núcleo) y *eucariota* (*eu*, verdadero; *karyon*, núcleo). Las células procariotas contienen relativamente pequeñas cantidades de DNA; el contenido del DNA de una bacteria se encuentra en los límites de 600 000 a ocho millones de pares de bases, lo cual es suficiente para codificar entre unas 500 y varios miles de proteínas.[2] Aunque una "simple" levadura de panadería tiene sólo un poco más DNA (12 millones de pares de bases que codifican alrededor de 6 200 proteínas) que los eucariotas más complejos, la mayoría de las células eucariotas posee mucha más información genética. Las células procariotas y las eucariotas poseen cromosomas que contienen DNA. Las células eucariotas muestran un número determinado de cromosomas separados, cada uno de los cuales posee una sola molécula lineal de DNA. En cambio, casi todos los procariotas que se han estudiado contienen un cromosoma circular único. Lo más importante es que el DNA cromosómico de los eucariotas, a diferencia del de los procariotas, se relaciona estrechamente con proteínas para formar un material nucleoproteínico complejo que se conoce como **cromatina**.

El citoplasma de los dos tipos de células también es muy diferente. El de una célula eucariota se conforma con una gran diversidad de estructuras, como es evidente por el análisis de micrografías electrónicas de cualquier célula vegetal o animal (fig. 1-10). Incluso las levaduras, las células eucariotas más simples, son mucho más complejas desde el punto de vista estructural que una bacteria promedio (compárese la fig. 1-18*a* y *b*), aunque estos dos organismos poseen un número de genes similar.

Las células eucariotas tienen una disposición de organelos limitados por membrana. Los organelos eucariotas incluyen mitocondria, donde la energía química está disponible para alimentar las actividades celulares; un retículo endoplásmico, en donde se elaboran muchas de las proteínas y lípidos de la célula; el aparato de Golgi, es el lugar en el que los materiales se clasifican, modifican y transportan a destinos celulares específicos, además de diferentes vesículas simples, limitadas por membranas de tamaños diferentes. Las células vegetales muestran organelos membranosos adicionales, incluidos los cloroplastos, los cuales son los sitios en los que se realiza la fotosíntesis, y muchas veces una gran vacuola única que puede ocupar la mayor parte del volumen celular. Tomadas como un grupo, las membranas celulares eucariotas sirven para dividir el citoplasma en compartimientos, dentro de los cuales se llevan a cabo actividades especializadas. En cambio, el citoplasma de las células procariotas está libre en esencia de estructuras membranosas. Las membranas fotosintéticas complejas de la cianobacteria son una gran excepción a esta generalización (véase fig. 1-15).

Las membranas citoplásmicas de las células eucariotas forman un sistema de canales interconectados y vesículas que trabajan en el transporte de sustancias de una parte a otra de la célula y entre su interior y el ambiente. A causa de su tamaño pequeño, la comunicación directa intracitoplásmica es menos importante en las células procariotas, en las que el flujo de materiales puede efectuarse por difusión simple.

Las células eucariotas también contienen numerosas estructuras sin membrana celular que las limite. Los túbulos alargados y filamentos del citoesqueleto están incluidos en este grupo y participan en la contractilidad celular, movimiento y soporte. Hasta hace poco tiempo se pensó que las células procariotas carecían de un citoesqueleto, pero se encontraron en algunas bacterias filamentos de citoesqueleto primitivo. Por el momento es posible afirmar que el citoesqueleto de los procariotas es mucho más simple en sentidos estructural y funcional en comparación con los eucariotas. Las células eucariotas y procariotas tienen ribosomas que son partículas no membranosas y funcionan como "mesas de trabajo" sobre las cuales las proteínas de las células se elaboran. No obstante que los ribosomas de las células procariotas y eucariotas poseen dimensiones considerables (los procariotas son más pequeños e incluyen muchos menos componentes), estas estructuras participan en el ensamblaje de proteínas con un mecanismo similar en ambos tipos de células. La figura 1-11 muestra una micrografía electrónica con seudocolor de una porción del extremo citoplásmico de un organismo eucariota unicelular. Ésta es una región de la célula en la que los organelos limitados por membrana tienden a estar ausentes.

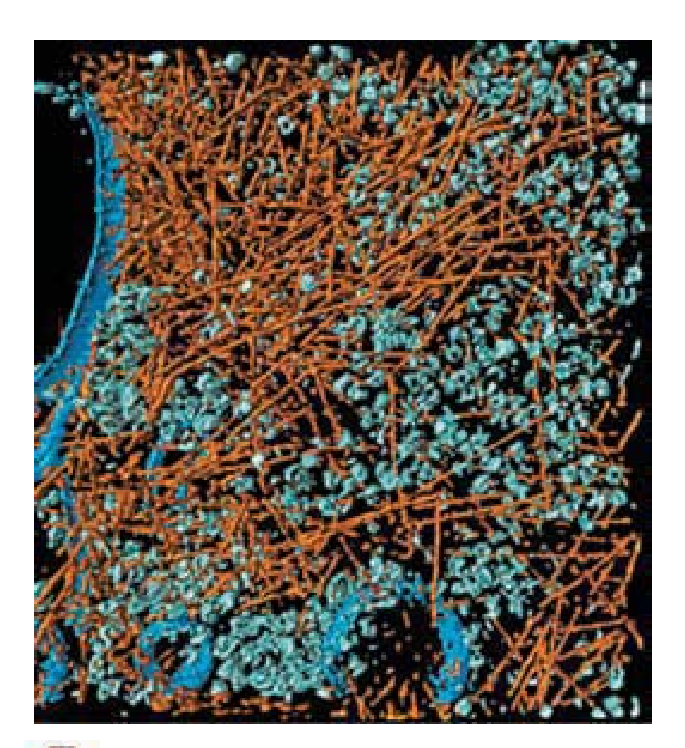


FIGURA 1-11 El citoplasma de una célula eucariota es un compartimiento saturado. Esta micrografía electrónica coloreada muestra una pequeña región cercana al borde de un organismo eucariota unicelular que se congeló de manera instantánea para su análisis microscópico. La apariencia tridimensional que se observa fue posible por medio de la captura de imágenes digitalizadas bidimensionales del espécimen en diferentes ángulos y la sobreposición de ellas con una computadora. Los filamentos del citoesqueleto se muestran en rojo, los complejos macromoleculares (sobre todo ribosomas) en verde y las membranas celulares en azul. (Reimpresa con autorización de Ohad Medalia, et al., Science 298:1211, 2002, cortesía de Wolfgang Baumeister, Copyright © 2002 American Association for the Advancement of Science.)

[2] Ocho millones de pares de bases equivalen a una molécula de DNA de alrededor de 3 mm de largo.

La micrografía muestra filamentos individuales de citoesqueleto (rojo) y otros complejos macromoleculares grandes del citoplasma (verde). Casi todos estos complejos son ribosomas. Este tipo de imagen hace evidente que el citoplasma de una célula eucariota está lleno, lo cual deja poco espacio para la fase soluble del citoplasma, el **citosol**.

Otras diferencias relevantes pueden reconocerse entre las células eucariotas y procariotas. Las primeras se dividen por un proceso complejo de mitosis, en el cual los cromosomas duplicados se condensan en estructuras compactas separadas por un sistema que contiene microtúbulos (fig. 1-12). Este aparato, que se conoce como *huso mitótico*, permite a cada célula hija recibir una cantidad equivalente de material genético. En los procariotas no hay compactación de los cromosomas ni huso mitótico. El DNA se duplica y las dos copias se separan de manera sencilla y precisa por el desarrollo de una membrana celular entre las dos.

La mayor parte de los procariotas corresponde a organismos asexuados, ya que sólo contienen una copia de su único cromosoma y carecen de procesos comparables a la meiosis, formación de gametos o fecundación verdadera. Aunque en los procariotas no hay una reproducción sexual verdadera, algunos son capaces de tener *conjugación*, en la cual un fragmento de DNA se transfiere de una célula a otra (fig. 1-13). Sin embargo, la célula receptora casi nunca recibe un cromosoma completo de la célula donadora y el estado en el cual la célula receptora contiene su DNA y el de su compañera es transitorio, ya que la célula regresa pronto a su condición de un solo cromosoma. Aunque los procariotas no suelen ser tan eficientes como los eucariotas en el intercambio de DNA con otros miembros de su propia especie, captan e incorporan ácido desoxirribonucleico ajeno que se encuentra en el ambiente con más frecuencia que los eucariotas, lo cual ha tenido considerable impacto en la evolución microbiana (pág. 28).

Las células de tipo eucariota poseen diversos mecanismos de locomoción compleja, mientras que los de los procariotas son relativamente sencillos. El movimiento de una célula procariota se lleva a cabo mediante un filamento delgado de proteína llamado *flagelo*, el cual sobresale de una célula y es capaz de girar (fig. 1-14*a*). La rotación del flagelo ejerce presión contra el líquido circundante y da lugar a que la célula se impulse a través del medio.

Algunas células eucariotas, incluidos muchos protistas y células germinales, también poseen flagelos, pero las versiones eucariotas son mucho más complejas que los filamentos proteicos simples de las bacterias (fig. 1-14*b*), y el movimiento lo genera un mecanismo diferente.

En los párrafos anteriores se mencionaron varias de las diferencias más relevantes entre los niveles de organización celular procariota y eucariota. Se revisan muchos de estos puntos en capítulos posteriores. Antes de asegurar que los procariotas son inferiores, se debe considerar que estos organismos han perma-

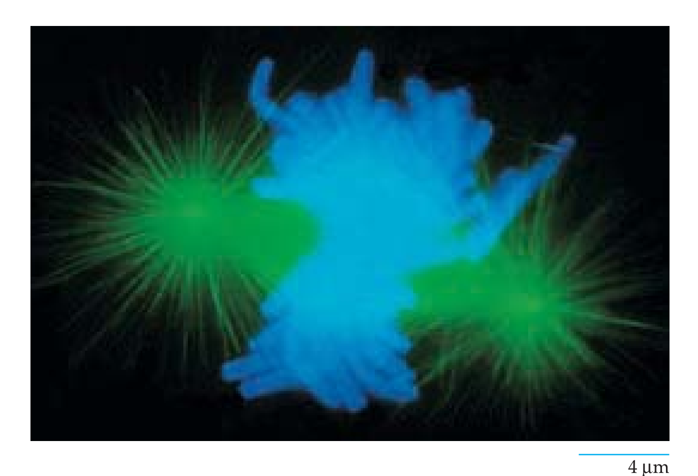


FIGURA 1-12 La división celular en eucariotas requiere el ensamble de un aparato muy elaborado llamado huso mitótico, que separa cromosomas y está construido sobre todo por microtúbulos. En esta micrografía, los microtúbulos aparecen en verde porque están enlazados de manera específica por un anticuerpo unido a un colorante verde fluorescente. Los cromosomas, que casi se habían separado en dos células hijas cuando se fijó dicha célula, están teñidos de azul. (CORTESÍA DE CONLY L. RIEDER.)

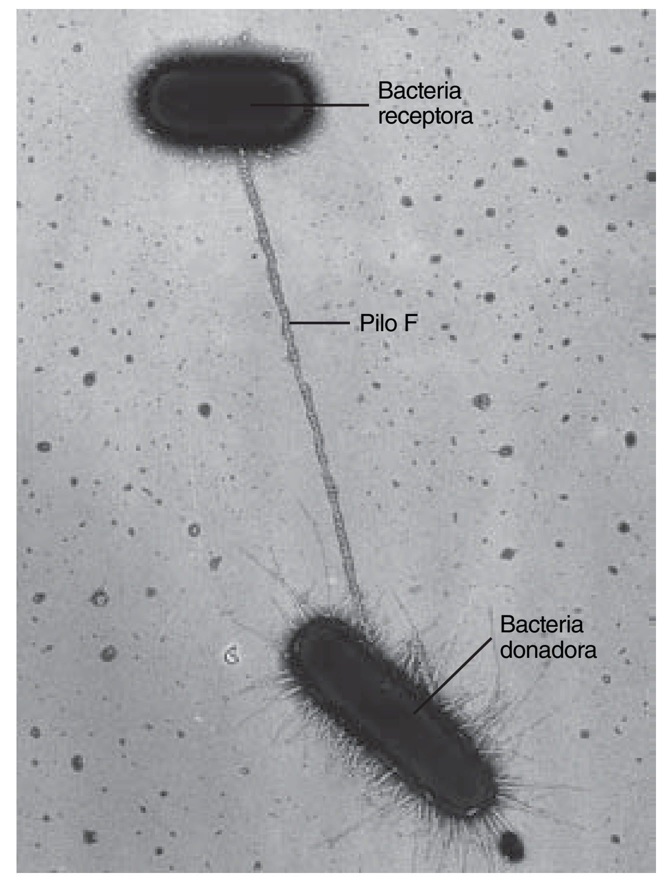
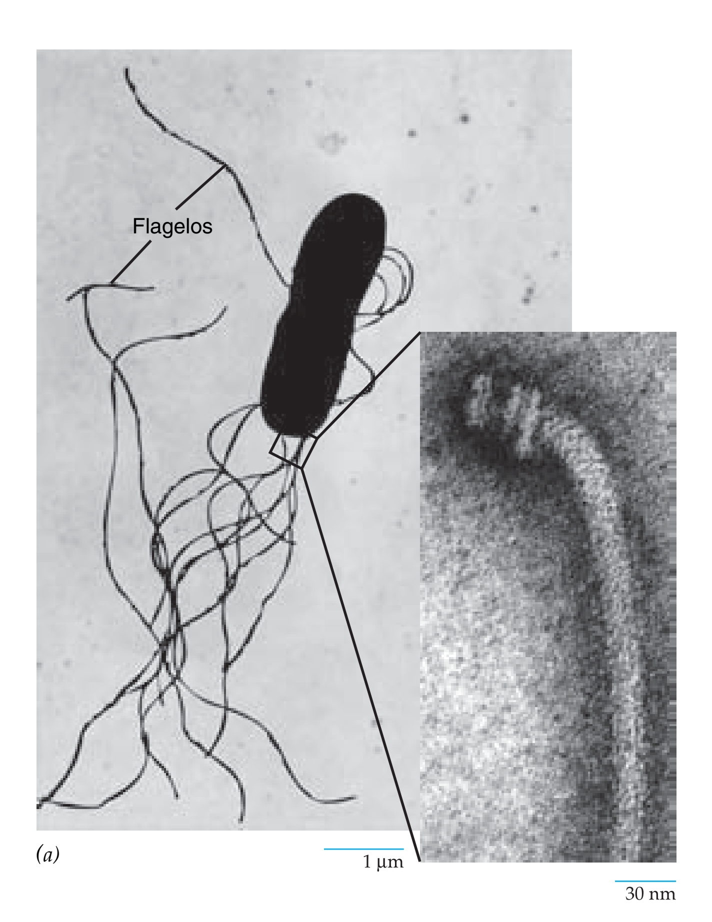


FIGURA 1-13 Conjugación bacteriana. Micrografía electrónica que muestra un par de bacterias en conjugación unido por una estructura de la célula donadora conocida como pilo F, a través de la cual se transfiere el DNA. (CORTESÍA DE CHARLES C. BRINTON, JR. Y JUDITH CARNAHAN.)



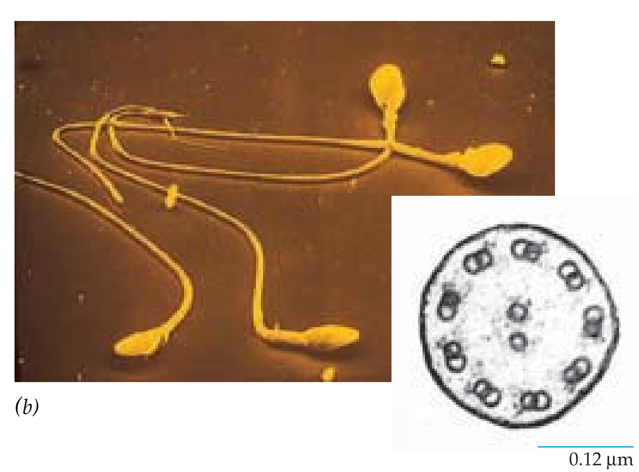


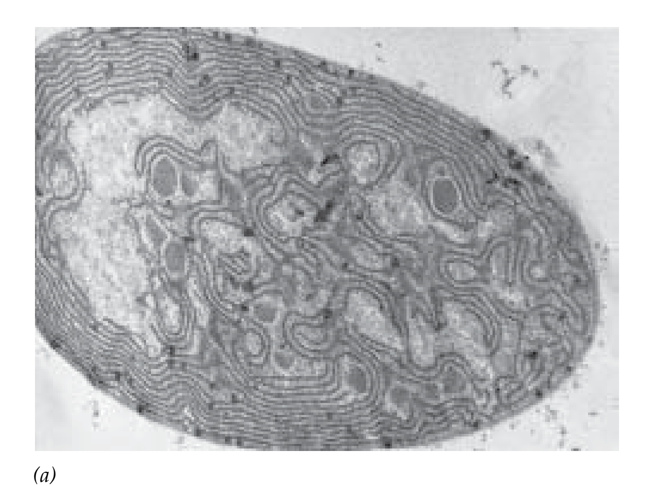
FIGURA 1-14 Diferencia entre flagelos procariotas y eucariotas. *a*) La bacteria *Salmonella* con sus numerosos flagelos. El recuadro muestra una vista amplificada a gran aumento de una parte del flagelo bacteriano único, que consta sobre todo de una sola proteína llamada flagelina. *b*) Cada uno de estos espermatozoides humanos está provisto de un movimiento ondulatorio de un flagelo único. El recuadro representa una sección transversal del flagelo de un espermatozoide de mamífero cerca de la punta. Los flagelos de las células eucariotas son tan parecidos que esta sección transversal podría ser la de un protista o un alga verde. (*A*, TOMADA DE BERNARD R. GERBER, LEWIS M. ROUTLEDGE Y SHIRO TAKASHIMA, J MOL BIOL 71:322, 1972. © 1972, CON AUTORIZACIÓN DE PUBLISHER ACADEMIC PRESS; ELSEVIER SCIENCE, RECUADRO CORTESÍA DE JULIUS ADLER Y M. L. DEPAMPHILIS; *B*, DAVID M. PHILLIPS/VISUALS UNLIMITED; RECUADRO TOMADO DE DON W. FAWCETT/VISUALS UNLIMITED.)

necido en la Tierra por más de tres mil millones de años y en este momento millones de ellos se encuentran sobre la superficie del cuerpo humano o consumen en abundancia los nutrimentos que se hallan en el tubo digestivo. Por lo común se considera a estos microorganismos como criaturas individuales y solitarias, pero descubrimientos recientes han mostrado que viven en complejas comunidades multiespecíficas llamadas *biopelículas*. Diferentes células en una biopelícula pueden realizar distintas actividades especializadas, lo cual no difiere de lo que ocurre en el caso de las células de una planta o un animal. Obsérvese también que, desde el punto de vista metabólico, los procariotas son organismos muy complejos y muy evolucionados. Por ejemplo, una bacteria como *Escherichia coli*, un habitante común del tubo digestivo de los humanos y las cajas de cultivo del laboratorio, tiene la capacidad de vivir y prosperar en un medio que contiene uno o dos compuestos orgánicos de bajo peso molecular y pocos iones inorgánicos. Otras bacterias son capaces de vivir con una dieta que sólo consiste en sustancias inorgánicas. Se ha identificado una especie de bacteria en pozos de miles de metros de profundidad que vivía en rocas basálticas y producía hidrógeno molecular (H_2) debido a las reacciones inorgánicas que llevaba a cabo. Por otro lado, las células eucariotas que tienen mayor capacidad metabólica requieren gran variedad de compuestos orgánicos, incluidos un gran número de vitaminas y otras sustancias esenciales que ellas no pueden sintetizar por sí mismas. De hecho, muchos de estos componentes esenciales de la dieta los producen las bacterias que habitualmente viven en el intestino grueso.

Tipos de células procariotas

Las diferencias entre las células procariotas y eucariotas se basan de manera primaria en su complejidad estructural (como se detalla en el cuadro 1-1) y no en las relaciones filogenéticas. Los procariotas están divididos en dos grandes grupos taxonómicos o dominios: Archaea (o arqueobacterias) y Bacteria (o Eubacteria). De acuerdo con la opinión actual, los miembros de archaea se vinculan de forma más estrecha con los eucariotas respecto de otros grupos de procariotas (las bacterias). Los experimentos que llevaron a descubrir que la vida está representada por tres distintas ramas se discuten en la sección Vías experimentales al final del capítulo.

El dominio archaea incluye a varios grupos de organismos cuyos lazos evolutivos entre unos y otros se manifiestan por similitudes de la secuencia nucleótida de sus ácidos nucleicos. Las especies más conocidas de archaea son las que viven en ambientes extremos e inhóspitos; a menudo se conocen como "extremófilas". Entre los organismos de archaea figuran los metanógenos (procariotas capaces de convertir los gases CO_2 e H_2 en gas metano [CH_4]); los halófilos (procariotas que viven en ambientes en extremo salados, como el mar Muerto o algunas cuencas oceánicas profundas con salinidad equivalente a la del $MgCl_2$ 5M); acidófilos (procariotas que tienen preferencia por ambientes ácidos, que viven a un pH tan bajo como cero, como los que se encuentran en los líquidos que drenan de las minas abandonadas), y termófilos (procariotas que viven a muy altas temperaturas). En este último grupo se incluye a las hipertermófilas, que viven en chimeneas hidrotermales del fondo marino. Al poseedor del registro más elevado en este grupo se



(a)

(b)

FIGURA 1-15 Cianobacterias. *a*) Micrografía electrónica de una cianobacteria que ilustra las membranas citoplásmicas en las que se realiza la fotosíntesis. Estas membranas concéntricas son muy parecidas a las membranas tilacoides presentes dentro de los cloroplastos de las células vegetales, una característica que apoya la hipótesis de que los cloroplastos evolucionaron a partir de las cianobacterias simbióticas. *b*) A las cianobacterias que viven dentro del pelo de los osos polares se atribuye el color verdoso extraño de su pelaje. (*A*, CORTESÍA DE NORMA J. LANG; *B*, CORTESÍA DE ZOOLOGICAL SOCIETY OF SAN DIEGO.)

le denomina "cepa 121", porque es capaz de vivir y dividirse en agua supercaliente a una temperatura de 121°C, que resulta ser la temperatura usada para esterilizar equipo quirúrgico en autoclave.

Todos los otros procariotas se clasifican en el dominio de las bacterias. Este dominio incluye a las células vivas más pequeñas, los micoplasmas (0.2 μm de diámetro), que también son los únicos procariotas conocidos sin una pared celular y que contienen un genoma con apenas 500 genes. Las bacterias están presentes en todos los ambientes conocidos sobre la Tierra, desde los hielos polares antárticos hasta los desiertos más secos de África y los confines internos de las plantas y animales. Asimismo hay que mencionar a las bacterias que viven en sustratos rocosos situados a varios kilómetros de profundidad. Se piensa que algunas de estas comunidades bacterianas se aislaron de la vida en la superficie hace más de 100 millones de años. Los procariotas más complejos son las cianobacterias. Éstas poseen elaboradas disposiciones de membranas citoplásmicas, que sirven como sitios para la fotosíntesis (fig. 1-15*a*). Las membranas citoplásmicas de las cianobacterias son muy parecidas a las membranas fotosintéticas presentes dentro de los cloroplastos de las células vegetales. Como en las plantas, organismos eucariotas, la fotosíntesis en cianobacterias se lleva a cabo al romper las moléculas de agua para liberar oxígeno molecular.

Muchas cianobacterias no sólo son capaces de realizar la fotosíntesis, sino también la **fijación de nitrógeno**, esto es, la conversión de nitrógeno (N_2) gaseoso en formas reducidas de nitrógeno (como amoniaco, NH_3) que pueden utilizar las células en la síntesis de compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, incluidos aminoácidos y nucleótidos. Estas especies celulares capaces de efectuar la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno pueden sobrevivir con los recursos esenciales: luz, N_2, CO_2 y H_2O. Por lo tanto, no sorprende que las cianobacterias sean los primeros organismos que colonizan las rocas sin vida formadas por una erupción volcánica. Otro hábitat poco común ocupado por las cianobacterias se muestra en la figura 1-15*b*.

Diversidad procariota La mayoría de los microbiólogos conoce sólo aquellos microorganismos que son capaces de crecer en un medio de cultivo. Cuando un paciente, con alguna infección de las vías respiratorias o urinarias acude con su médico, uno de los primeros pasos es la solicitud del cultivo del agente patógeno. Una vez que se ha cultivado, el microorganismo puede identificarse y es posible establecer el tratamiento adecuado. El cultivo de la *mayoría* de procariotas causantes de enfermedades fue relativamente sencillo, pero esto mismo no fue posible para aquellos que viven de manera libre en la naturaleza. El problema es agravado por el hecho de que los procariotas son apenas visibles en un microscopio óptico y con frecuencia su morfología no se puede precisar. Hasta la fecha se han identificado menos de 5 000 especies de procariotas mediante las técnicas tradicionales, lo que representa ¡menos de una décima parte de 1% de los millones de especies de procariotas que se piensa que existen en la Tierra! El reconocimiento de diversidad de comunidades procariotas se incrementó de manera espectacular en los años recientes con la introducción de técnicas moleculares que no requieren el aislamiento de un organismo en particular.

Supóngase que el objeto de estudio es la diversidad de procariotas que viven en las capas superficiales del océano Pacífico de la costa de California. En lugar de cultivar tales organismos, lo cual podría ser inútil, un investigador puede concentrar las células de una muestra de agua de océano, extraer el DNA y analizar ciertas secuencias de DNA presentes en la preparación. Todos los organismos comparten ciertos genes, por ejemplo, aquellos que codifican los RNA (ácido ribonucleico) presentes en los ribosomas o las enzimas de ciertas vías metabólicas. Aunque todos los organismos pueden compartir dichos genes, las secuencias de los nucleótidos que constituyen los genes varían de manera considerable de una especie a otra. Esto es la base de la evolución biológica. Mediante técnicas que revelen la variedad de secuencias de un gen particular en un hábitat particular, se aprende de inmediato acerca del número de especies que viven en ese ambiente.

Cuadro 1-2 Cantidad de biomasa de procariotas en el mundo

Ambiente	Número de células procariotas $\times 10^{28}$	Pg de C en procariotas*
Hábitat acuático	12	2.2
Superficie oceánica marina	355	303
Suelo terrestre	26	26
Capa profunda de la superficie terrestre	25-250	22-215
Total	415-640	353-546

*1 Pg (Petagramo) = 10^{15} g.
Fuente: W. B. Whitman et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 95:6581, 1998.

La misma conducta molecular se ha utilizado para explorar la notable diversidad de microbios que viven sobre o dentro del organismo humano, en ambientes como la boca, el tracto intestinal, la vagina y la piel. Las cavidades subgingivales de la boca, es decir, los espacios entre el diente y la encía, son hogar de una de las comunidades microbianas mejor estudiadas. Las bacterias que causan la caries dental, la gingivitis y la enfermedad cardiaca se incluyen entre estos microbios. El análisis de las secuencias de RNA sugiere que alrededor de 415 especies diferentes de bacterias viven en las cavidades subgingivales de la boca. A pesar de esfuerzos intensos por décadas, sólo fue posible cultivar cerca de la mitad de estos organismos.

Los biólogos han encontrado, con técnicas moleculares basadas en la secuenciación, que la mayoría de los hábitat sobre la Tierra están saturados de vida procariota aún no caracterizada. Un estimado de la cantidad de procariotas en los principales ambientes terrestres se muestra en el cuadro 1-2. Ahora se piensa que más de 90% de estos organismos vive bajo los sedimentos de la profundidad de los océanos y en los estratos superficiales del suelo. Hasta hace una década se presuponía que estos sedimentos profundos sólo estaban poblados de manera escasa por organismos vivos. El cuadro 1-2 también muestra un estimado de la cantidad de carbono que incorpora el mundo de las células procariotas. Para traducir este número a términos más familiares, es comparable a la cantidad total de carbono presente en toda la vida del mundo vegetal.

Tipos de células eucariotas: especialización celular

En muchos aspectos, las células eucariotas más complejas no se encuentran dentro de las plantas o animales, sino en los protistas, organismos de una sola célula (*unicelulares*), como los que se muestran en la figura 1-16. Todos los mecanismos necesarios para las actividades complejas en las cuales intervienen estos organismos (sensores ambientales, captación de alimento, eliminación del exceso de líquidos, evasión de depredadores) están confinados dentro de una sola célula.

Los organismos unicelulares complejos representan una vía evolutiva. Un camino alternativo ha llevado a la evolución de los organismos multicelulares en la cual diferentes tipos celulares especializados efectúan distintas actividades. Las células especializadas se forman por un proceso conocido como **diferenciación**. Por ejemplo, un óvulo humano fecundado experimentará un desarrollo embrionario que lleva a la formación de alrededor de 250 tipos distintos de células diferenciadas. Algunas células pasan a formar parte de una glándula digestiva específica, otras se convierten en componentes de un gran músculo esquelético, otras más constituyen un hueso, etcétera (fig. 1-17). La ruta de diferenciación seguida por cada célula embrionaria depende de manera fundamental de las señales que ésta recibe del ambiente circundante; dichas señales dependen a su vez de la posición de esta célula dentro del embrión. Como se discute en la sección Perspectiva humana en este capítulo, los investigadores han aprendido a controlar el proceso de diferenciación en cajas de cultivo y aplicar este conocimiento al tratamiento de las afecciones humanas complejas.

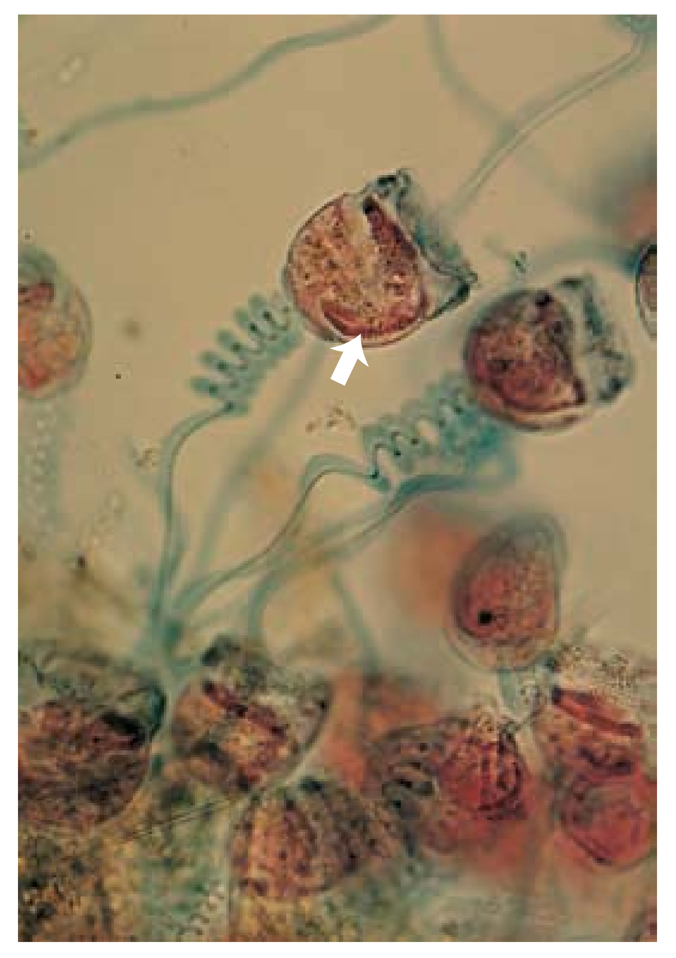


FIGURA 1-16 Vorticella, un protista ciliado complejo. Aquí se pueden observar varios de estos organismos unicelulares; la mayoría tiene contraída su "cabeza" debido al acortamiento de la banda contráctil en su tallo teñida de azul. Cada célula posee un gran núcleo llamado macronúcleo (flecha), que contiene muchas copias de los genes. (Carolina Biological Supply Co./Phototake.)

Como resultado de la diferenciación, distintos tipos celulares adquieren una apariencia característica y contienen materiales

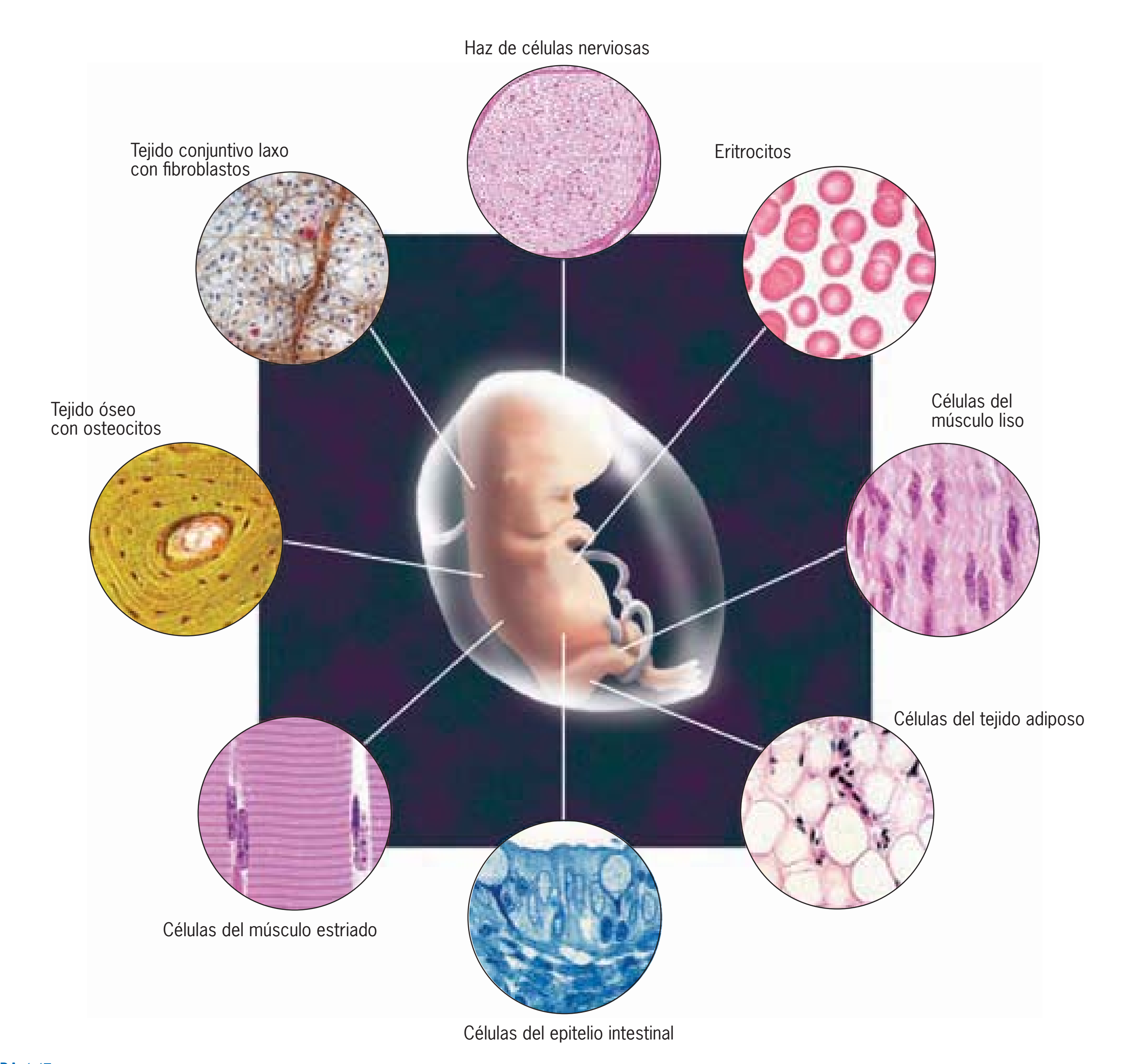
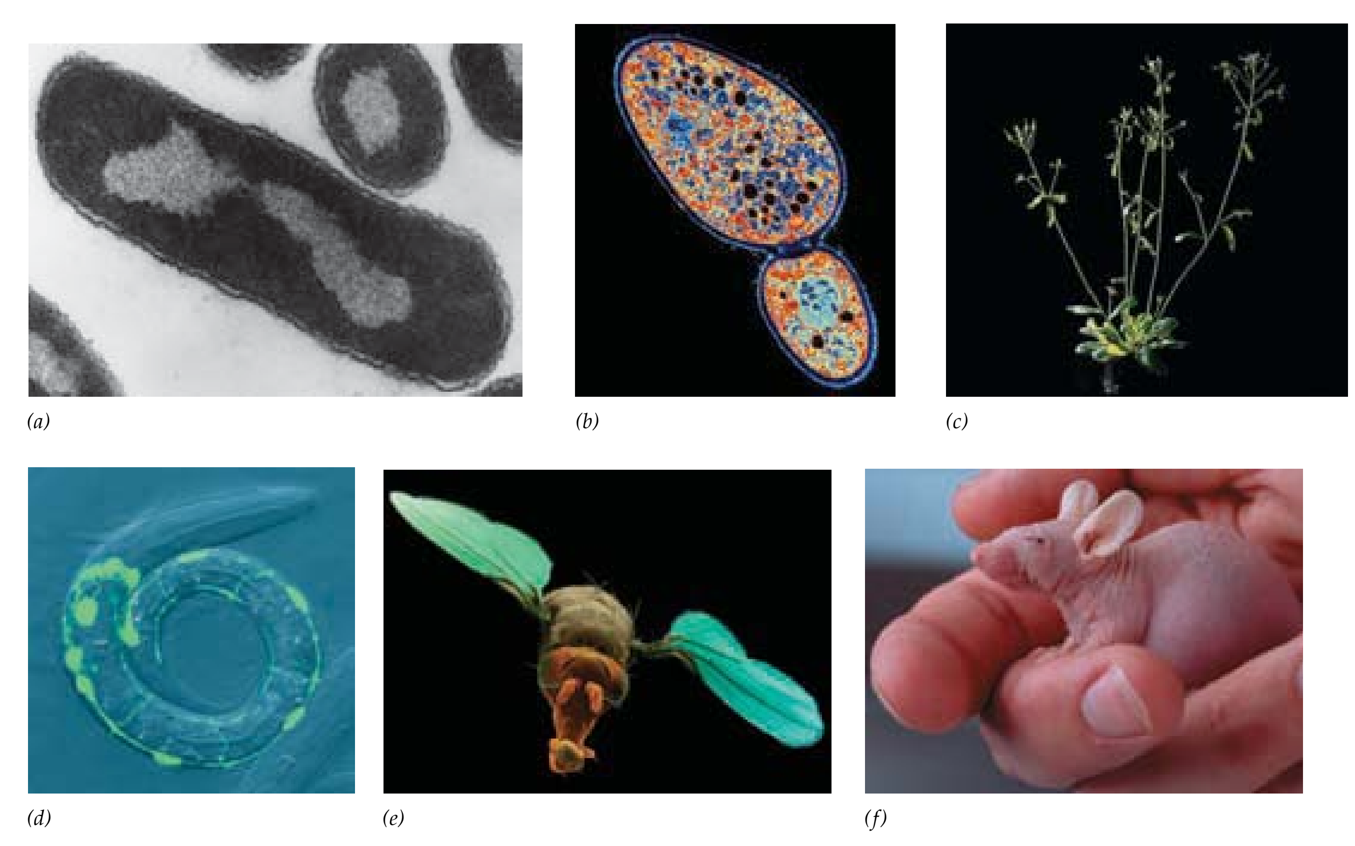


FIGURA 1-17 **Vías de diferenciación celular.** Algunos de los tipos de células diferenciadas presentes en los fetos humanos. (Micrografías, cortesía de Michael Ross, University of Florida.)

únicos. Las células musculoesqueléticas poseen una estructura de filamentos muy bien alineados, compuestos de proteínas contráctiles únicas; las células de cartílago están rodeadas por una matriz típica que contiene polisacáridos y por la proteína colágena, que en conjunto suministran el apoyo mecánico; los eritrocitos son estructuras en forma de disco y llevan la proteína hemoglobina, que transporta oxígeno, y así sucesivamente. No obstante, a pesar de sus múltiples diferencias, las células de una planta o animal están compuestas de organelos semejantes. Por ejemplo, las mitocondrias se localizan en todos los tipos celulares. Sin embargo, en un tipo celular pueden tener forma redonda y en otro un aspecto muy alargado. En cada caso, el número, apariencia y localización de los diferentes organelos pueden correlacionarse con la actividad de cada tipo celular. Se puede establecer una analogía con las diferentes secciones orquestales: todas ejecutan las mismas notas, pero varían por el arreglo de cada una y su carácter único y belleza.

Organismos modelo Los organismos vivos son muy diversos y los resultados obtenidos de un análisis experimental pueden depender del organismo en particular bajo estudio. Como resultado, los biólogos celulares y moleculares enfocan sus actividades de investigación en un pequeño número de "organismos representativos" u **organismos modelo**. Se espera que un cuerpo de conocimiento extenso basado en tales estudios constituya un marco de referencia que permita comprender los procesos básicos que son compartidos por muchos organismos, en especial el ser humano. Esto no quiere decir que muchos otros organismos no se utilicen ampliamente en el estudio de la biología celular y molecular. No obstante, seis organismos modelo, un procariota



(a) *(b)* *(c)*

(d) *(e)* *(f)*

FIGURA 1-18 **Seis organismos modelo.** *a*) *Escherichia coli* es una bacteria de forma alargada que vive en el tubo digestivo de seres humanos y otros mamíferos. Gran parte de lo que se discute acerca de la biología molecular básica de la célula, incluidos los mecanismos de replicación, transcripción y traducción, se trabajó de manera original en este organismo procariota. La organización relativamente simple de una célula procariota se ilustra en esta micrografía electrónica (compárese con la parte *b* de una célula eucariota). *b*) *Saccharomyces cerevisiae*, mejor conocida como levadura de panadería o cervecería. Éste es el eucariota menos complejo y más estudiado; contiene un número sorprendente de proteínas que son homólogas de las proteínas de las células humanas. Tales proteínas ejercen una función conservada en los dos organismos. La especie tiene un genoma pequeño que codifica cerca de 6 200 proteínas; puede crecer en estado haploide (una copia de cada gen por célula en lugar de dos, como en la mayoría de las células eucariotas); y puede crecer en condiciones aeróbicas (con O_2) y anaeróbicas (sin O_2). Es ideal para la identificación de genes a través del uso de mutantes. *c*) *Arabidopsis thaliana*, un miembro de un género de plantas de mostaza, tiene un genoma muy pequeño (120 millones de pares de bases) para una planta con flores, un tiempo de generación rápido, una producción numerosa de semillas y crecimiento de unos cuantos centímetros de altura. *d*) *Caenorhabditis elegans*, un nematodo microscópico, se integra con un número definido de células (alrededor de 1 000), cada una de las cuales se desarrolla de acuerdo con un patrón preciso de divisiones celulares. El animal tiene una pared corporal transparente y un tiempo de generación corto y manejable para los análisis genéticos. Esta micrografía muestra el sistema nervioso de la larva, que se marcó con la proteína verde fluorescente (GFP). El premio Nobel 2002 se concedió a los investigadores pioneros de este estudio. *e*) *Drosophila melanogaster*, la mosca de la fruta, es un eucariota pequeño pero complejo que fue por casi 100 años el animal favorito para los estudios genéticos. El organismo también es adecuado para estudios de biología molecular del desarrollo y de las bases neurológicas del comportamiento. Ciertas células de larvas tienen cromosomas gigantes, cuyos genes individuales se pueden identificar para estudios de evolución y expresión genética. *f*) *Mus musculus*, el ratón doméstico común, se aloja y mantiene de manera sencilla en el laboratorio. Se han desarrollado miles de cepas diferentes desde el punto de vista genético, muchas de las cuales se guardan como embriones congelados debido a la falta de espacio para albergar a animales adultos. El "ratón desnudo" que se muestra en la fotografía se desarrolló como animal atímico y es capaz de aceptar injertos de piel humana sin rechazo. (*A* Y *B*, BIOPHOTO ASSOCIATES/PHOTO RESEARCHERS; *C*, JEAN CLAUDE REVY/PHOTOTAKE; *D*, DE KARLA KNOBEL, KIM SCHUSKE Y ERIK JORGENSEN, TRENDS GENETICS, VOL. 14, COVER #12, 1998; *E*, DENNIS KUNKEL/VISUALS UNLIMITED; *F*, TED SPIEGEL/CORBIS IMAGES.)

y cinco eucariotas, han captado mucho la atención: una bacteria, *E. coli*; una levadura, *Saccharomyces cerevisiae*; una planta con flor, *Arabidopsis thaliana*; un nematodo, *Caenorhabditis elegans*; una mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, y un ratón, *Mus musculus*. Cada uno de ellos posee ventajas específicas que los torna en particular útiles como objeto de investigación y para responder ciertas preguntas. Asimismo, cada uno de estos organismos se representa en la figura 1-18 y en el pie de la misma figura se describen algunas de sus ventajas como sistemas de investigación. Este texto se enfoca en los resultados obtenidos a partir de los estudios realizados en sistemas de mamíferos, sobre todo en el ratón y el cultivo de células de mamífero, en virtud de que estos hallazgos son más aplicables a los seres humanos. Aun así, habrá ocasión de describir las investigaciones efectuadas en células de otras especies.

Es sorprendente descubrir cuán semejante es el hombre a nivel celular y molecular respecto de estos organismos mucho más pequeños y simples.

PERSPECTIVA HUMANA

Posibilidad de una terapia con remplazo celular

Para una persona con corazón o hígado insuficiente, un trasplante de órgano es la mejor esperanza para su supervivencia y el reingreso a la vida productiva. El trasplante de órganos es uno de los logros más importantes de la medicina moderna, aunque su aplicación está muy limitada por la disponibilidad de donantes de órganos y el alto riesgo de rechazo inmunitario. Es importante imaginar las posibilidades del cultivo celular y de órganos en el laboratorio y la utilización de éstos para reemplazar las partes dañadas o sin función del organismo. Si bien este planteamiento es parte de la ciencia ficción, estudios realizados en años recientes dieron a los investigadores la esperanza de que un día este tipo de terapia llegará a realizarse. Para entender mejor el concepto de la terapia de reemplazo celular puede considerarse un procedimiento llevado a cabo en la actualidad conocido como *trasplante de médula ósea*, en el cual las células se obtienen del interior de los huesos pélvicos de un individuo donante y se transfunden al cuerpo de un receptor.

El trasplante de médula ósea se practica sobre todo para tratar linfomas y leucemias, los cuales son tipos de cáncer que afectan la naturaleza y el número de las células blancas sanguíneas. Para efectuar este procedimiento, el paciente se expone a un alto nivel de radiación o se trata con sustancias tóxicas, o ambas cosas; estos agentes destruyen a las células cancerosas pero también a las células relacionadas con la formación de células sanguíneas de las series roja y blanca. El tratamiento tiene efecto debido a que las células que generan la sangre son de manera particular muy sensibles a la radiación y las sustancias tóxicas. Una vez que las células que forman la sangre de un individuo se destruyen, se reemplazan con células de la médula ósea trasplantadas que proceden de un donante sano. La médula ósea puede regenerar el tejido sanguíneo del receptor del trasplante debido a que contiene un pequeño porcentaje de células que pueden proliferar y restituir el tejido de la médula ósea que produce la sangre en el paciente.[1] Las células que producen sangre en la médula ósea se denominan **células madre hematopoyéticas** (o **CMH**), que se encargan del reemplazo de millones de células sanguíneas de las series roja y blanca que envejecen y mueren cada día en el organismo (véase fig. 17-5). De manera asombrosa, una *sola* CMH es capaz de reconstruir el sistema hematopoyético completo (que forma sangre) de un ratón radiado. Cada vez más padres piden que se guarde la sangre del cordón umbilical del recién nacido como una forma de "póliza de seguro de células madre" contra la posibilidad de que su hijo llegue a sufrir una enfermedad susceptible de ser tratada con la administración de CMH.

Las **células madre** se definen como células indiferenciadas capaces de: a) autorrenovarse, esto es, de abastecerse a sí mismas, y b) sufrir diferenciación en dos o más tipos celulares maduros. Las CMH de la médula ósea son tan sólo un tipo de células madre. La mayoría, si no todos los órganos de un ser humano adulto contienen células madre capaces de reponer las células específicas del tejido en que se encuentran. Incluso el cerebro del adulto, que no es reconocido por su capacidad de regeneración, contiene células madre que pueden generar nuevas neuronas y células gliales (las células de sostén del cerebro). En la figura 1*a* se muestra una célula madre individual hallada en tejido musculoesquelético adulto; se piensa que estas "células satélite", como se les llama, se dividen y diferencian según sea necesario para la reparación de tejido muscular lesionado. La capacidad de estas células madre musculares de proliferar y repoblar una gran extensión de músculo se demuestra en la figura 1*b*. Estas células madre trasplantadas fueron capaces de diferenciarse en nuevo tejido muscular.

Existen pequeñas dudas si el trasplante de células podría mejorar la calidad de vida de muchos pacientes. Por ejemplo, ya se ha mostrado que el trasplante de células de los islotes pancreáticos productoras de insulina a partir de órganos de cadáver donante y el trasplante de neuronas productoras de dopamina de fetos abortados podrían mejorar la salud de pacientes con diabetes y enfermedad de Parkinson, respectivamente. Pero ni los donantes de órganos ni los fetos humanos son una fuente adecuada de células para trasplante. En cambio, muchos investigadores creen que algún día las células madre de adulto serán un recurso asequible para tratar a pacientes con órganos enfermos. Sin embargo, por el momento el campo se ha visto plagado de una gran cantidad de publicaciones contradictorias acerca de la utilidad de administrar células madre de adulto o su progenie diferenciada a animales con diversos trastornos médicos inducidos, que van desde diabetes hasta ataque cardiaco o insuficiencia hepática. A pesar de estos problemas, se han realizado varios ensayos clínicos con diversos tipos de células madre de adulto. Los más grandes de tales ensayos se han efectuado en pacientes a quienes sus propias células de médula ósea se han infundido en el corazón luego de sufrir un ataque cardiaco. Al parecer, las células cardiacas trasplantadas mejoran el funcionamiento del corazón, pero los

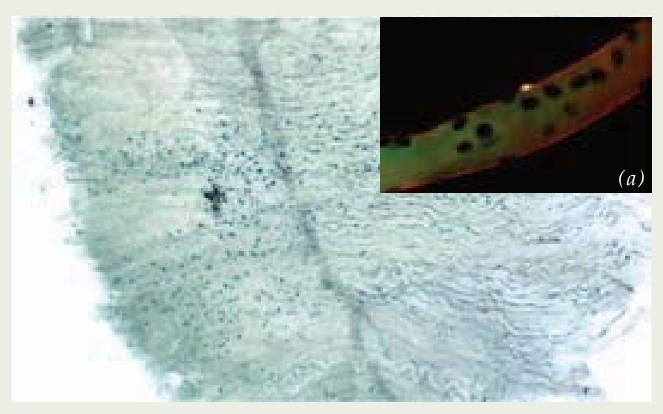


FIGURA 1 Célula madre muscular de un adulto. *a*) Parte de una fibra muscular, con sus múltiples núcleos teñidos de azul. Una célula madre individual (amarillo) se observa alojada entre la superficie externa de la fibra muscular y una capa extracelular (o membrana basal), teñida de rojo. La célula madre no diferenciada presenta este color amarillo porque expresa una proteína que no se encuentra en la fibra muscular diferenciada. *b*) Parte de un músculo tibial de ratón en el cual todos los núcleos teñidos de azul se derivan por división de unas pocas células madre trasplantadas. Para obtener este resultado experimental, una sola miofibrilla de donante (que contiene unas 20 células madre) se había trasplantado tres semanas antes en un músculo que se irradió para destruir su propia población de células madre. Las descendientes de las células madre trasplantadas se encuentran en todo el músculo. (Tomada de Charlotte A. Collins, et al., Cell 122:291, 2005; con autorización de Cell Press.)

[1] El trasplante de médula ósea puede compararse con una simple transfusión sanguínea en la que el receptor obtiene células sanguíneas diferenciadas (en especial glóbulos rojos y plaquetas) presentes en la circulación.

resultados son preliminares y no se ha determinado el mecanismo de la acción benéfica de las células. Al parecer, las células madre de la médula ósea trasplantada no se diferencian directamente en células de músculo cardiaco, sino que tienen un efecto indirecto, es posible que estimulen la formación de nuevos vasos sanguíneos. De hecho, la pregunta acerca de si las células madre de un tipo de tejido pueden "transdiferenciarse" en células de un tipo de tejido distinto queda sin responder a pesar de los grandes esfuerzos por disipar esa duda.

La mayor expectación en el campo del trasplante celular, y los debates más encendidos, proviene no de estudios sobre células madre de adulto sino de investigaciones sobre **células madre embrionarias** (**ES**, *embryonic stem*), que se aíslan de embriones de mamífero de etapas muy tempranas (véase fig. 2). Se trata de células de embrión en una etapa temprana que dan origen a las diversas estructuras del feto. A diferencia de las células madre de adulto, las células ES pueden cultivarse por tiempo indefinido y no hay controversia acerca de su capacidad de diferenciación. Las células ES son *pluripotenciales*; es decir, pueden diferenciarse en cualquier tipo de célula del cuerpo. En la mayoría de los casos, las células ES se han aislado de embriones proporcionados por clínicas de fecundación in vitro. A nivel mundial, se dispone para investigación experimental de docenas de líneas de células madre embrionarias humanas genéticamente distintas, cada una derivada de un solo embrión.

El objetivo a largo plazo de los investigadores clínicos es aprender a inducir a las células ES para que se diferencien en cultivo en los tipos celulares deseados que puedan usarse para la terapia de reemplazo celular. Se ha logrado un avance considerable en este sentido, y varios estudios muestran que los trasplantes de células derivadas de ES diferenciadas pueden mejorar la salud de animales con órganos enfermos o dañados. Es probable que en los primeros ensayos en seres humanos se utilicen células, llamadas oligodendrocitos, que producen las vainas de mielina que recubren las células nerviosas (véase fig. 4-5). Mediante ensayo y error se observó que cuando las células ES humanas se cultivaban en un medio con insulina, hormona tiroidea y una combinación de factores de crecimiento, se diferenciaban en colonias de oligodendrocitos puras. Cuando se colocaban implantes de estos oligodendrocitos humanos en ratas con lesiones paralizantes de la médula espinal, los animales recuperaban un grado considerable de movilidad. Se planean ensayos clínicos en los cuales estos oligodendrocitos derivados de ES se implantarán en pacientes con lesión reciente de la médula espinal. El principal riesgo de este tipo de procedimiento es la presencia inadvertida de células ES no diferenciadas entre la población celular diferenciada. Las células ES no diferenciadas son capaces de formar un tipo de tumor benigno, llamado teratoma, que podría contener una masa peculiar de diversos tejidos diferenciados, incluidos cabellos y dientes. La formación de un teratoma dentro del sistema nervioso central podría tener consecuencias graves.

Aunque las células madre del adulto son incapaces de experimentar la diferenciación ilimitada que es característica de las células ES, tienen una ventaja sobre éstas en el sentido de que pueden aislarse del individuo que se trata y por tanto no están expuestas al rechazo inmunitario cuando se usan en una reposición celular ulterior. Sin embargo, quizá sea posible "personalizar" células ES de modo que posean la misma constitución genética que el individuo al que se trata, y de este modo no estén sujetas al ataque del sistema inmunitario del receptor. Es probable que esto pueda lograrse mediante un procedimiento continuo, mostrado en la figura 2, que comienza con un óvulo no fecundado obtenido de los ovarios de una mujer donante no emparentada. En este método, el núcleo del óvulo no fecundado sería sustituido por el núcleo de una célula del paciente por tratar, lo cual daría al óvulo la misma composición cromosómica del paciente. Entonces se permitiría al óvulo desarrollarse hasta una etapa embrionaria temprana, y las células ES se extraerían, cultivarían e inducirían a diferenciarse en el tipo de células necesarias para el paciente. Este mismo método se modificaría para tratar a individuos con determinados trastornos hereditarios, como distrofia muscular o inmunodeficiencias, al corregir el

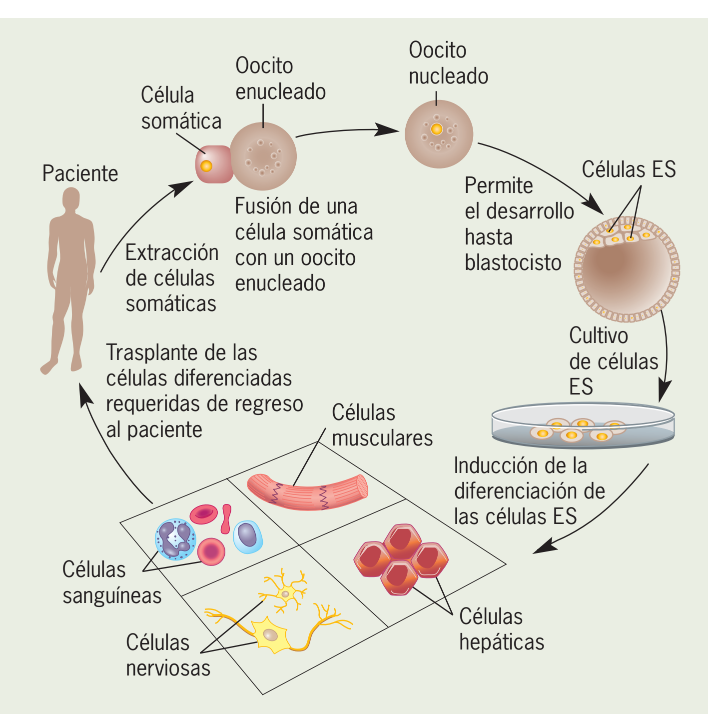


FIGURA 2 Procedimiento para obtener células diferenciadas para la terapia de reemplazo celular. Se toma un pequeño fragmento de tejido del paciente y un núcleo de una de las células se implanta en un oocito donante al que antes se le eliminó su núcleo. Se permite que el oocito (huevo) resultante se desarrolle como embrión temprano, se obtienen y cultivan las células madre embrionarias derivadas. Se induce a una población de estas mismas células a diferenciarse en las células requeridas, las que luego se implantan en el paciente para restaurar la función del órgano afectado. En 2005 se publicaron experimentos de este tipo, pero se descubrió que eran fraudulentos.

defecto genético en las células ES aisladas antes de ponerlas en cultivo. Debido a que este procedimiento implica la formación de un embrión humano que sólo se usa como fuente de células ES, existen importantes cuestiones éticas que deben resolverse antes de que pueda practicarse de manera sistemática.

Al momento en que este escrito se realizó, el gobierno de Estados Unidos estaba impedido para financiar investigaciones sobre cualquier línea de ES que haya sido creada después de agosto de 2001. ¿Y si fuera posible generar células ES a partir de un embrión sin afectar su supervivencia o potencial de desarrollo? Los técnicos que trabajan en clínicas de fecundidad continuamente toman una de las células de un embrión incipiente en busca de defectos cromosómicos o genéticos de otros tipos. La célula aislada es destruida en este proceso de prueba, pero suele ser posible colocar el resto del embrión en el aparato reproductor de la madre para que se desarrolle normalmente. En fechas recientes se ha informado que las células individuales tomadas de un embrión de ocho o 10 células pueden colocarse en un medio de cultivo apropiado, donde tienen posibilidades de desarrollarse en una línea de células madre pluripotenciales . En otras palabras, una célula individual de un embrión humano puede dar origen a células capaces de diferenciarse en cualquier tipo de célula somática que pudiera necesitarse, sin destruir el embrión del cual se tomó la célula. Si bien no es probable que este tipo de procedimiento se generalice en las clínicas populares, tal vez constituya un recurso para obtener células madre embrionarias humanas que puedan estudiarse en proyectos de investigación patrocinados por el gobierno.

Varios laboratorios han venido trabajando en la búsqueda de métodos para "personalizar" células ES sin recurrir a la formación de un embrión humano potencialmente viable. En un enfoque, los investigadores generaron embriones activando oocitos con un estímulo químico en vez de hacerlo por la vía normal de activación, que implica la fusión de un oocito con un espermatozoide. Estos oocitos activados dan origen a embriones llamados *partenotos*, incapaces de desarrollarse hasta el término pero que contienen células ES pluripotenciales. Los partenotos como fuente de células ES tienen la ventaja adicional sobre los embriones normales de que contienen los genes de un solo progenitor. Debido a que son genéticamente más sencillas que las células ES normales, las células ES de un partenoto serían mucho más fáciles de adaptar para los receptores que necesitan el trasplante celular. Un banco de unos pocos cientos de estas líneas de células ES sería suficiente para cubrir las necesidades de la mayoría de los miembros de la población.

El tamaño de las células y sus componentes

La figura 1-19 muestra las dimensiones relativas de diferentes estructuras de interés en biología celular. De forma habitual se utilizan dos unidades de medición lineal para describir el interior de una célula: el **micrómetro** (μm) y el **nanómetro** (nm). Un micrómetro es igual a 10^{-6} metros y un nm a 10^{-9} metros. El **angstrom** (Å), que es igual a una décima parte de un nanómetro, lo utilizan muchas veces los biólogos moleculares para cuantificar dimensiones atómicas. De manera simple, un angstrom equivale al diámetro de un átomo de hidrógeno. Las moléculas biológicas grandes (p. ej., macromoléculas) se describen en angstroms o nanómetros. La mioglobina, una proteína globular típica cuyo tamaño es de 4.5 nm × 3.5 nm × 2.5 nm, y las proteínas muy largas (como la colágena o la miosina) son mayores de 100 nm de longitud y el DNA es de 2.0 nm de ancho. Los complejos macromoleculares, como los ribosomas, microtúbulos y microfilamentos, oscilan entre 5 y 25 nm de diámetro. A pesar de sus pequeñas dimensiones, estos complejos macromoleculares son de forma destacada las complejas "nanomáquinas" capaces de realizar diversas actividades mecánicas, químicas y eléctricas.

Las células y sus organelos se cuantifican con mayor facilidad en micrómetros. Por ejemplo, el núcleo posee un diámetro aproximado de 5 a 10 μm y la mitocondria, de 2 μm de largo. Por lo general, las células procariotas se encuentran en los límites de 1 a 5 μm de largo y las células eucariotas de 10 a 30 μm. Hay diferentes razones por las cuales casi todas las células son tan pequeñas. Considérense las siguientes.

- La mayoría de las células eucariotas posee un solo núcleo que contiene únicamente dos copias de la mayoría de los genes. Debido a que los genes sirven como moldes para la producción de RNA mensajeros portadores de información, una célula sólo puede producir un número limitado de estos RNA en un tiempo específico. El gran volumen citoplásmico de la célula hace posible sintetizar los mensajes que requiere esta célula.
- A medida que una célula incrementa su tamaño, decrece la relación área de superficie/volumen.[3] La capacidad de una célula para intercambiar sustancias con su medio ambiente es proporcional a su área de superficie. Si una célula creciera más allá de cierto tamaño, su superficie podría ser insuficiente para captar las sustancias (p. ej., oxígeno, nutrimentos) necesarias para sustentar sus actividades metabólicas. Las células especializadas en la absorción de solutos, como las del epitelio intestinal, poseen casi siempre microvellosidades

[3] El lector puede constatar este enunciado calculando el área superficial y el volumen de un cubo cuyos lados miden 1 cm en comparación con un cubo con lados de 10 cm. La relación área superficial/volumen del cubo pequeño es más grande en grado notable que la del cubo grande.

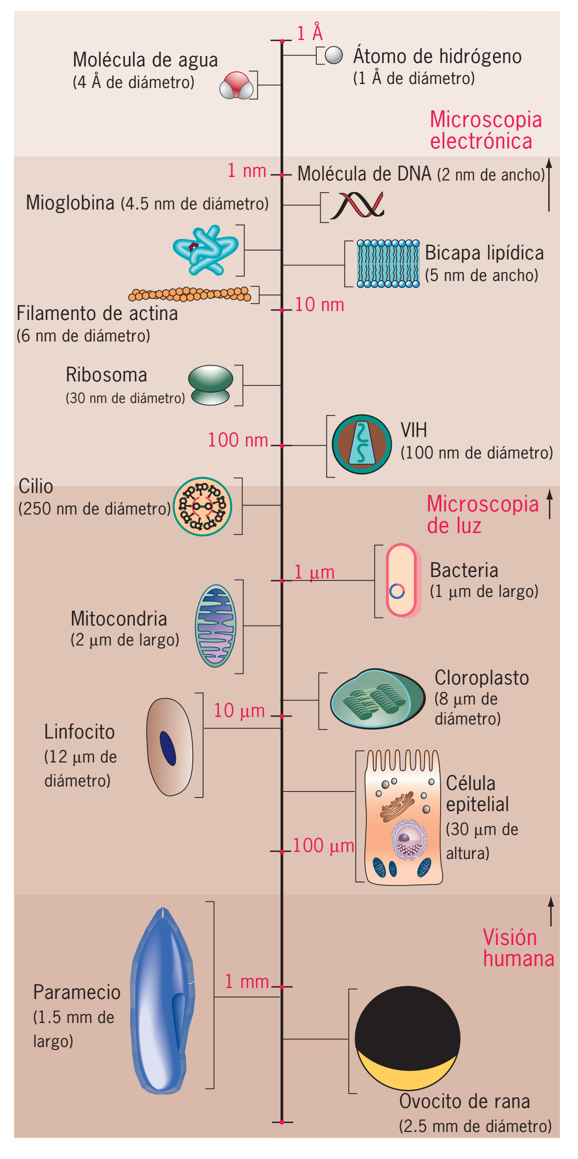


FIGURA 1-19 Tamaños relativos de las células y sus componentes. Las estructuras que se muestran son diferentes en tamaño por más de siete órdenes de magnitud.

por medio de las cuales se incrementa en gran medida el área superficial disponible para el intercambio (véase fig. 1-3). El interior de una gran célula vegetal lo ocupa las más de las veces una gran vacuola llena de líquido, en lugar de un citoplasma activo a nivel metabólico (véase fig. 8-36*b*).

- Una célula depende en buena medida del movimiento aleatorio de las moléculas (*difusión*). Por ejemplo, el oxígeno debe difundirse desde la superficie de la célula a través del citoplasma hasta el interior de su mitocondria. El tiempo requerido para esta difusión es proporcional al cuadrado de la distancia que se recorre. Por ejemplo, el O_2 necesita sólo 100 microsegundos para difundirse a una distancia de un micrómetro, pero un tiempo de 10^6 veces mayor para hacerlo a una distancia de un milímetro. Cuando una célula es grande y aumenta la distancia de la superficie al interior, el tiempo requerido para el movimiento por difusión de las sustancias hacia dentro y fuera de una célula activa en sentido metabólico puede ser muy grande e inoperante.

REVISIÓN ?

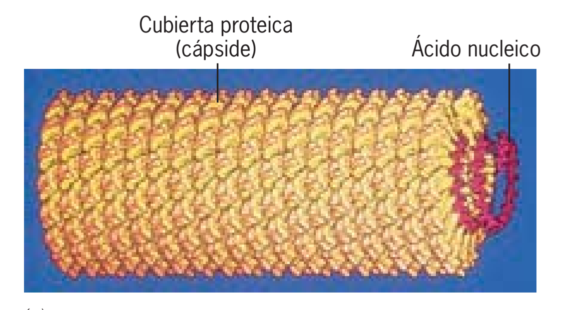
1. Compare una célula procariota y una eucariota respecto de sus diferencias en estructura, función y metabolismo.
2. ¿Cuál es la importancia de la diferenciación celular?
3. ¿Por qué las células casi siempre son microscópicas?
4. Si una mitocondria midiera 2 μm de largo, ¿a cuántos angstroms, nanómetros y milímetros equivaldría?

1.4 VIRUS

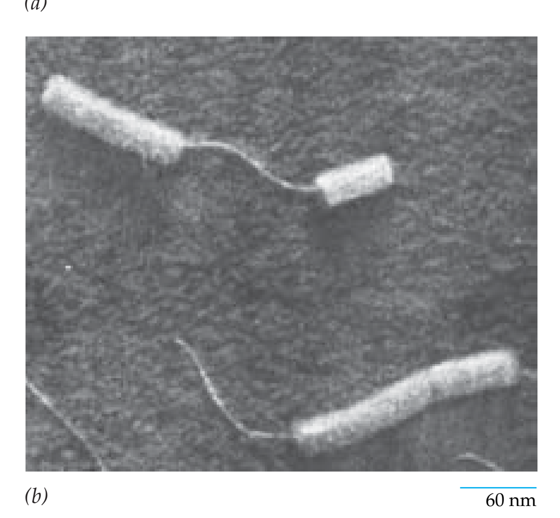
Hacia finales del siglo XIX, los trabajos de Louis Pasteur y otros habían convencido al mundo científico de que las enfermedades infecciosas de las plantas y los animales se debían a la presencia de bacterias, pero los estudios de la enfermedad del mosaico del tabaco en plantas de este tipo y la fiebre aftosa del ganado apuntaron a la existencia de otro tipo de agente infeccioso. Se encontró, por ejemplo, que la savia de una planta de tabaco enferma podía transmitir la enfermedad del mosaico a una planta sana, aunque la savia no mostró evidencias de bacterias cuando se examinó bajo un microscopio óptico. Para obtener más información en cuanto al tamaño y naturaleza del agente infeccioso, el biólogo ruso Dimitri Ivanovsky hizo pasar la savia de una planta enferma a través de filtros cuyos poros eran tan pequeños que retardaron el paso de las bacterias más pequeñas conocidas. El filtrado no dejó de ser infectivo, lo que llevó a Ivanovsky a concluir que ciertas anormalidades eran secundarias a agentes patógenos más pequeños y, de modo presumible, más simples que las bacterias diminutas que se conocían. Estos patógenos se conocieron como **virus**.

En 1935, Wendell Stanley, del *Rockefeller Institute*, notificó que el virus causante de la enfermedad del mosaico del tabaco pudo cristalizarse y que los cristales eran infecciosos. Los componentes que los formaron tenían una estructura muy ordenada, definida y eran mucho menos complejos que las células más simples. Stanley concluyó de manera errónea que el virus del mosaico del tabaco (TMV) era una proteína. De hecho, el TMV es una partícula semejante a un bastón que consiste en una sola molécula de RNA cubierta por una capa helicoidal compuesta de subunidades proteicas (fig. 1-20).

Los virus provocan una docena de enfermedades humanas, entre ellas el sida, poliomielitis, influenza, exantemas, sarampión y algunos tipos de cáncer (véase sección 16.2). Los virus se presentan en una amplia variedad de formas diferentes, tamaños y estructura, si bien comparten ciertas características comunes. Todos los virus son parásitos intracelulares obligados, esto es, no se pueden reproducir a menos que se encuentren dentro de una célula huésped. Según sea el virus específico, el huésped puede ser una planta, animal o bacteria. Fuera de las células vivas, los virus existen como partículas, o **viriones**, que son una especie de paquete macromolecular. El virión contiene una cantidad pequeña de material genético que, en relación con el virus del que se trate, puede ser un DNA o RNA de cadena sencilla o doble. Llama la atención que algunos virus tienen tan sólo tres a cuatro



(*a*)



(*b*)

FIGURA 1-20 Virus del mosaico del tabaco (TMV). *a*) Modelo de una porción de una partícula del TMV. Las subunidades proteicas son idénticas en toda la partícula, cuya forma es alargada y en su interior se encuentra una cadena sencilla de RNA en forma de hélice (rojo). *b*) Micrografía electrónica de partículas del TMV captadas después del tratamiento con fenol para eliminar las subunidades proteicas de la parte media de la partícula, que se observa en la parte superior de la fotografía, y la remoción de la proteína de los extremos, que se observa en la partícula inferior. Las partículas intactas son de unos 300 nm de longitud y 18 nm de diámetro. (*A*, CORTESÍA DE GERALD STUBBS, KEIICHI NAMBA Y DONALD CASPAR; *B*, CORTESÍA DE M. K. CORBETT.)

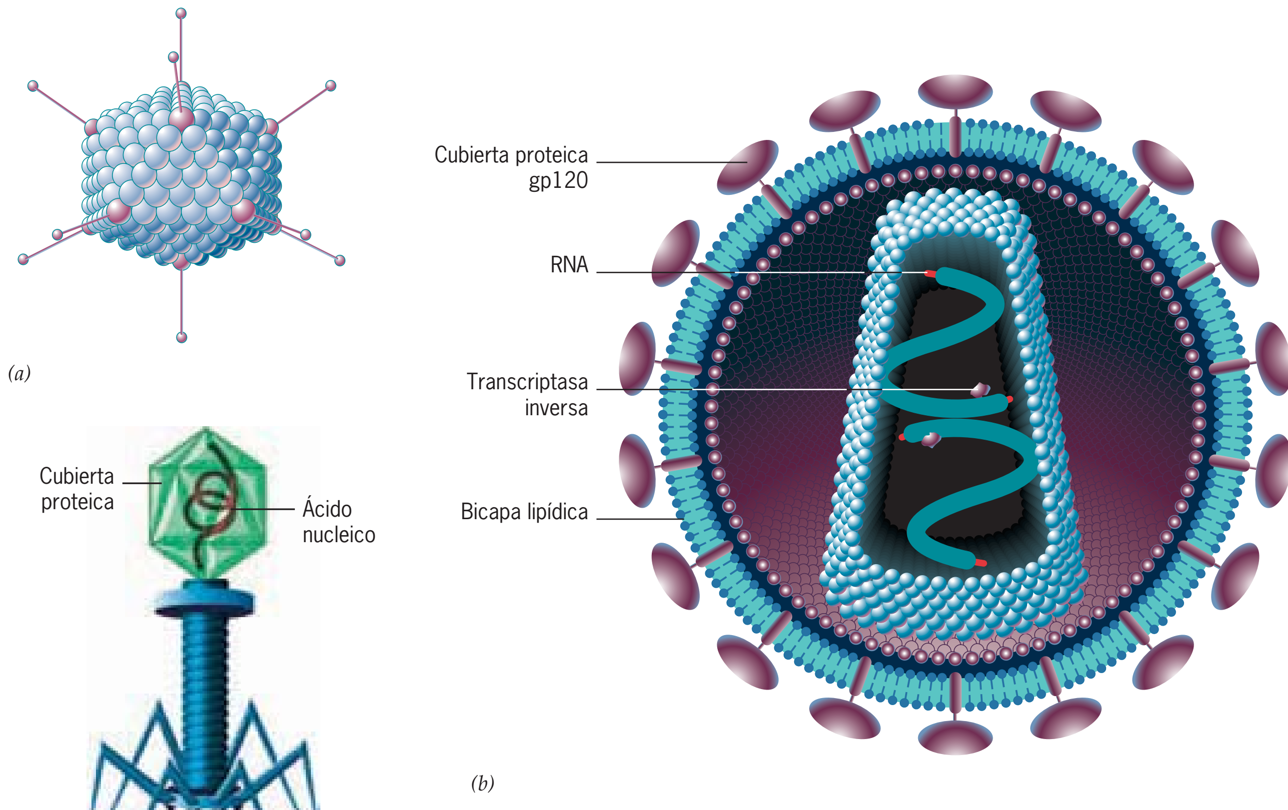


FIGURA 1-21 Diversidad viral. Estructuras de *a*) un adenovirus; *b*) un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y *c*) un bacteriófago T típico. (Nota: estos virus no se representan a la misma escala.)

genes diferentes, pero existen otros que pueden tener hasta varios cientos de ellos. El material genético del virión está rodeado por una cápsula proteínica, o *cápside*. Los viriones son agregados macromoleculares, partículas inanimadas que por sí mismas son incapaces de reproducirse, metabolizar o realizar cualquier otra de las actividades relacionadas con la vida. Por ello, los virus no se consideran organismos y no se les describe como seres vivos.

Las cápsides virales generalmente están constituidas por un número específico de subunidades. Existen muchas ventajas en la construcción mediante subunidades; una de las más obvias es la economía de información genética. Si una cubierta viral está conformada por muchas copias de una sola proteína, como es el caso del TMV, o de pocas proteínas, como sucede con las cubiertas de muchos otros virus, sólo se necesita uno o unos pocos genes que codifiquen las proteínas de esta estructura. Muchos virus tienen una cápside cuyas subunidades están organizadas en un poliedro, es decir, una estructura con caras planas. Una forma poliédrica en particular común en los virus es el *icosaedro* de 20 lados. Por ejemplo, los adenovirus que causan las enfermedades respiratorias en los mamíferos poseen una cápside icosaédrica (fig. 1-21*a*). En muchos virus de animales, incluido el *virus de la inmunodeficiencia humana* (VIH) causante del sida, la cápside proteica está rodeada por una envoltura lipídica externa que proviene de la membrana plasmática modificada de la célula huésped, obtenida cuando el virus salió por gemación de la superficie celular (fig. 1-21*b*). Los virus bacterianos o *bacteriófagos* se encuentran entre los virus más complejos (fig. 1-21*c*). Los bacteriófagos T (que se utilizaron en experimentos clave que revelaron la estructura y propiedades del material genético) consisten en una cabeza poliédrica que contiene DNA, un tallo cilíndrico por medio del cual el DNA se inyecta dentro de la célula bacteriana y un grupo de fibras en el extremo; en su conjunto, la partícula viral ofrece el aspecto de un módulo de alunizaje.

Cada virus posee en su superficie una proteína que es capaz de unirse a un componente definido de la superficie de la célula huésped. Por ejemplo, la proteína que se proyecta de la superficie de la partícula del VIH (definida como gp120 en la figura 1-21*b*, recibe ese nombre por tratarse de una glucoproteína de 120 000 daltons)[4] interactúa con una proteína específica (llamada CD4) que se localiza en la superficie de algunos leucocitos sanguíneos, lo cual facilita la entrada de los virus a la célula huésped. La interacción de las proteínas virales y las del huésped determina la especificidad del virus, esto es, los tipos de célula huésped en los que los virus pueden entrar e infectar. Algunos virus tienen un amplio *espectro de huéspedes* y son capaces de infectar células de diferentes órganos o especies huéspedes variadas. Por ejemplo, el virus que causa la rabia es capaz de infectar muchos tipos de mamíferos huéspedes que incluyen perros, murciélagos y seres humanos. Sin embargo, la mayoría de los virus tiene un espectro relativamente reducido de huéspedes. Esto es casi siempre cierto, por ejemplo, para los virus del resfriado común y la influenza humana, que sólo pueden infectar las células del epitelio respiratorio del huésped humano.

---

[4] Un dalton equivale a una unidad de masa atómica, la masa de un átomo de hidrógeno (^{1}H).

Un cambio en la especificidad de la célula hospedadora puede tener notables consecuencias. Este aspecto es ilustrado de manera dramática por la pandemia de gripe de 1918, que causó la muerte de más de 30 millones de personas en todo el mundo. El virus fue especialmente letal entre adultos jóvenes, que no suelen sucumbir a la gripe. De hecho, las 675 000 muertes por el virus en Estados Unidos redujeron temporalmente las expectativas de vida en varios años. En uno de los logros más aclamados (y polémicos) de los últimos años, los investigadores pudieron determinar la secuencia genómica del virus causante de la pandemia y reconstituir éste en su estado plenamente virulento. Para ello aislaron los genes virales (que son parte de un genoma constituido por ocho moléculas separadas de RNA que codifican 11 proteínas diferentes) de los restos preservados de personas que murieron a causa de la infección 90 años antes. Las muestras mejor preservadas se obtuvieron de una mujer amerindia que fue sepultada en el permafrost de Alaska. La secuencia del "virus 1918" sugirió que el patógeno había pasado de aves a personas. Aunque el virus había acumulado una cantidad considerable de mutaciones, que lo adaptaron para un hospedador mamífero, nunca había intercambiado material genético con un virus de la gripe humana, una posibilidad que se contempló hasta entonces.

El análisis de la secuencia del virus 1918 ha aportado algunos indicios que explican por qué fue tan letal y cómo se transmite de manera tan eficiente de una persona a otra. Con base en la secuencia genómica, el virus 1918 se reconstituyó en partículas infecciosas las cuales en pruebas de laboratorio se observó que eran excepcionalmente virulentas. Mientras que los ratones de laboratorio suelen sobrevivir a la infección por virus de la gripe humana moderna, la cepa 1918 reconstituida mató a 100% de los ratones infectados y produjo enormes cantidades de partículas virales en los pulmones de esos animales. Dado el riesgo potencial para la salud pública, el informe de la secuencia completa del virus 1918 y su reconstitución sólo se realizaron después de la aprobación por páneles de seguridad gubernamentales y la demostración de que las vacunas y los fármacos antigripales existentes protegen a los ratones contra el virus reconstituido.

A pesar del tamaño viral que es en extremo pequeño, en fechas recientes se ha podido seguir su travesía en la célula bajo el microscopio *óptico*. Esta hazaña se logró debido a que por primera vez se marcó cada partícula viral con una molécula fluorescente y entonces se observaron pequeños vehículos luminosos. El movimiento individual de varias partículas virales durante el curso de una infección se muestra en la figura 1-22. Por medio de esta metodología se ha podido advertir que los virus penetran de modo abrupto la membrana de la célula huésped en menos de una décima de segundo y alcanzan el núcleo en 15 minutos, donde toman el control de la capacidad de síntesis celular. Como lo ejemplifica este experimento, el uso de marcadores fluorescentes marcó un hito en el estudio de la actividad celular, al suministrar a los investigadores la capacidad de visualizar procesos que de otra forma sería imposible observar.

Existen dos tipos básicos de infección viral: 1) En la mayoría de los casos, los virus secuestran las actividades de síntesis normales de la célula hospedadora y las reorientan para utilizar los materiales disponibles para elaborar ácidos nucleicos virales y proteínas que forman un virión nuevo. En otras palabras, los virus no crecen como las células; se ensamblan de forma directa

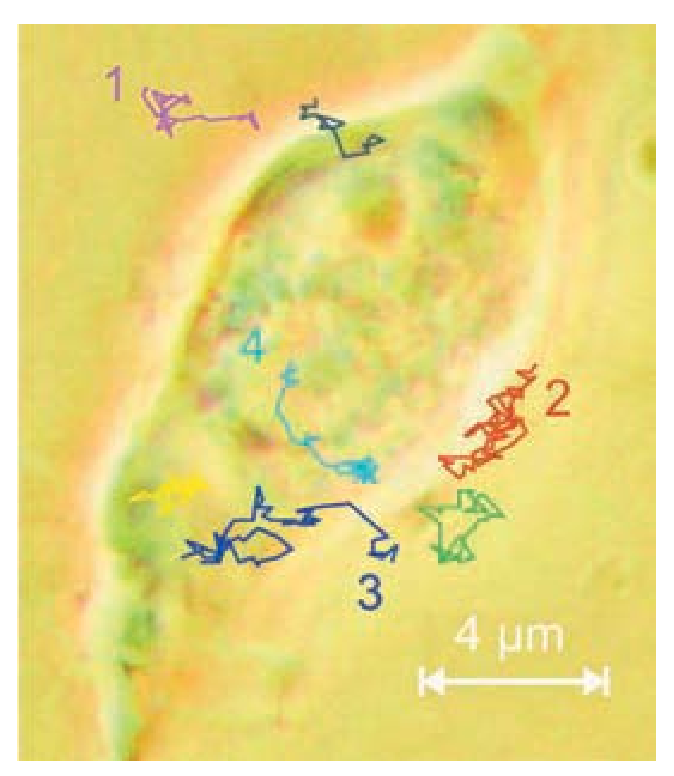
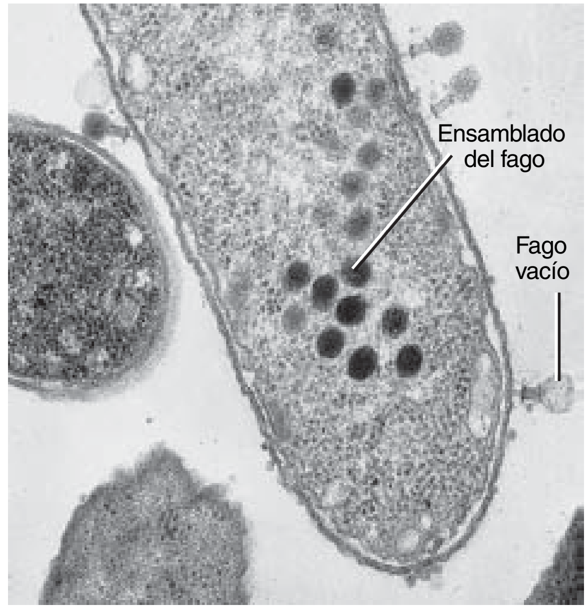


FIGURA 1-22 Rastreo de un virus bajo el microscopio. Las líneas coloreadas son las rutas que toman los virus individuales marcados con fluorescencia; se muestra la forma en que "abordan" para infectar una célula viva del tipo HeLa. Las trayectorias revelan diferentes estados de infección. El virus causante de las trayectorias 1 y 2 se difunde fuera de la célula; los virus de la trayectoria 3 han penetrado la membrana celular externa y se encuentran en el citoplasma; los virus de la trayectoria 4 ingresan al núcleo celular. (Reimpresa con autorización de G. Seisenberger, et al., Science 294:1929, 2001, cortesía de C. Bräuchle, Copyright © 2001 American Association for the Advancement of Science.)

a partir de sus elementos para crear viriones de tamaño maduro. Por último, la célula infectada se disuelve (*lisis*) y libera una nueva generación de partículas virales capaces de infectar a las células próximas. Un ejemplo de este tipo de infección *lítica* se muestra en la figura 1-23*a*. 2) En otros casos, el virus infectivo no causa la muerte de la célula hospedadora, sino que en lugar de ello inserta (*integra*) su DNA en el DNA cromosómico de la célula hospedadora. El DNA viral integrado se conoce como **provirus**. Un provirus integrado puede tener diferentes efectos que dependen de la célula hospedadora y el tipo de virus. Por ejemplo:

- Las células bacterianas que poseen un provirus funcionan con normalidad hasta que se exponen a un estímulo, como la radiación ultravioleta, la cual activa al DNA viral latente, lo que da lugar a la lisis celular y liberación de la progenie viral.
- Algunas células animales que contienen un provirus crean una nueva progenie viral por gemación de la superficie celular sin producir lisis de la célula infectada. El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) actúa de esa forma; una célula infectada puede permanecer viva por un tiempo y funcionar como una fábrica para la producción de viriones nuevos (fig. 1-23*b*).



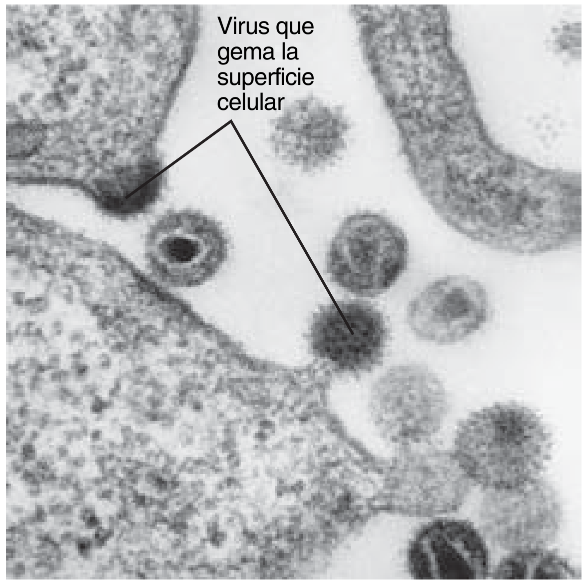


FIGURA 1-23 Una infección viral. *a*) Micrografía que muestra un estadio tardío en la infección de una célula bacteriana por un bacteriófago. Las partículas virales se ensamblan dentro de la célula y las cubiertas vacías del fago están presentes en la superficie celular. *b*) La micrografía muestra partículas de VIH que geman a partir de un linfocito humano infectado. (*A*, CORTESÍA DE JONATHAN KING Y ERIKA HARTWIG; *B*, CORTESÍA DE HANS GELDERBLOM.)

- Algunas células animales que poseen un provirus pierden el control de su propio crecimiento y división y experimentan una conversión a células malignas. Este fenómeno se estudia en el laboratorio con facilidad al infectar cultivos celulares con el virus tumoral apropiado.

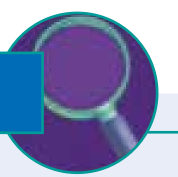
Los virus no carecen de virtudes; puesto que las funciones de los genes virales semejan las actividades de los genes del hospedador, los investigadores han utilizado por décadas a los virus como herramienta de investigación para analizar el mecanismo de la replicación del DNA y la expresión génica en sus hospedadores, que son más complejos. De modo adicional, los virus se usan como vectores para introducir genes foráneos en células humanas, una técnica que sirve como base para su aplicación en el tratamiento de las enfermedades humanas por medio de la terapéutica génica. En fecha reciente, los virus que matan a las bacterias y los insectos pueden tomar un papel destacado en la guerra contra las plagas por insectos y patógenos bacterianos. Los bacteriófagos se han utilizado por décadas en el tratamiento de infecciones bacterianas en Europa del este y Rusia, mientras que los médicos de Occidente emplean los antibióticos. Debido al aumento de la resistencia bacteriana para los antibióticos, los bacteriófagos pueden marcar el regreso a esta terapéutica con base en resultados prometedores realizados en ratones infectados. En la actualidad, varias compañías biotecnológicas producen bacteriófagos con miras a combatir infecciones bacterianas y proteger determinados alimentos contra la contaminación bacteriana.

Viroides

De forma sorpresiva, en 1971 se descubrió que los virus no eran los tipos más simples de agentes infecciosos. En ese año T. O. Diener del *U.S. Department of Agriculture* comunicó que la enfermedad de la deformación fusiforme del tubérculo de la papa, que ocasiona que éstas se agrieten y formen nudos, se debía a un agente infeccioso formado por una molécula circular pequeña de RNA desprovista por completo de cubierta proteica. Diener llamó a este agente patógeno **viroide**. El tamaño del RNA de los viroides oscila entre 240 y 600 nucleótidos, la décima parte del tamaño de los virus más pequeños. No existen evidencias de que el RNA del viroide desnudo pueda codificar alguna proteína. En realidad, cualquier actividad bioquímica donde intervienen los viroides tiene lugar al usar las proteínas de la célula hospedadora. Por ejemplo, para duplicarse dentro de una célula infectada, el RNA del viroide utiliza la polimerasa II del RNA de la célula hospedadora, una enzima que transcribe el DNA del hospedador en RNA mensajero. Se piensa que los viroides provocan enfermedad al interferir con la vía normal de la expresión génica celular. Los efectos de esta infección en las cosechas puede ser grave: una enfermedad viroide llamada cadang-cadang (o muerte lenta) acabó con las palmeras cocoteras en plantaciones de las islas Filipinas y otro viroide causó grandes estragos a la industria de los crisantemos en Estados Unidos. El descubrimiento de un tipo diferente de agente infeccioso más simple que el viroide se describe en la sección Perspectiva humana del capítulo 2.

REVISIÓN ?

1. ¿Qué propiedades distinguen a un virus de una bacteria?
2. ¿Qué tipos de infecciones son capaces de causar los virus?, ¿cómo es posible estudiar a los virus bajo el microscopio óptico?
3. Compare y analice: nucleoide y núcleo; el flagelo de una bacteria y el de un espermatozoide; un microorganismo archaea y una cianobacteria; la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis; los bacteriófagos y los virus del mosaico del tabaco; un provirus y un virión.



VÍAS EXPERIMENTALES

Origen de las células eucariotas

Como se ha visto en este capítulo, las células se pueden dividir de manera apropiada en dos grupos: células procariotas y eucariotas. Al tiempo en que se propuso esta división de las células vivas, los biólogos se han mostrado fascinados con esta pregunta: ¿cuál es el origen de las células eucariotas? Existe un acuerdo general (pero no universal) de que las células procariotas: a) aparecieron antes que las células eucariotas y b) dieron lugar a ellas. El primer enunciado puede verificarse de manera directa a partir de los registros fósiles, que muestran que las células procariotas están presentes en rocas que datan de hace 2 700 millones de años (pág. 8), en promedio 1 000 millones de años, antes de que apareciera cualquier evidencia de las células eucariotas. El segundo enunciado se infiere del hecho de que los dos tipos celulares se hallan relacionados debido a que comparten muchas características complejas (p. ej., código genético, enzimas, vías metabólicas y membranas plasmáticas, que son muy semejantes) que pudieron evolucionar de manera independiente en organismos diferentes.

Hasta el año de 1970 se pensaba por lo general que las células eucariotas habían evolucionado a partir de las células procariotas por medio de un proceso evolutivo gradual en el cual los organelos de las células eucariotas llegaron a ser más complejos de manera progresiva. La aceptación de este concepto cambió de forma drástica tras los trabajos de Lynn Margulis de la *Boston University.* Margulis resucitó la idea propuesta y rechazada años atrás, según la cual ciertos organelos de una célula eucariota, de manera más notable la mitocondria y los cloroplastos, habían evolucionado de células procariotas pequeñas que se integraron al citoplasma de células hospedadoras más grandes.[1,2] Esta hipótesis se conoce como la **teoría endosimbiótica** dado que describe cómo una célula "compuesta" de mayor complejidad puede evolucionar a partir de dos o más células más simples que viven en una relación simbiótica.

Se presume que los ancestros procariotas más tempranos fueron células heterotróficas: *anaerobias* debido a que obtuvieron su energía a partir de materiales alimenticios sin la intervención de la molécula de oxígeno (O_2) y *heterotróficas* puesto que fueron incapaces de sintetizar compuestos orgánicos a partir de precursores inorgánicos (como CO_2 y agua), pero en lugar de ello tuvieron que obtener compuestos orgánicos antes elaborados a partir de su ambiente.

De acuerdo con la versión de la teoría endosimbiótica, un gran procariota heterotrófico y anaerobio ingirió a un pequeño procariota aerobio (paso 1, fig. 1). El pequeño procariota resistió la digestión dentro del citoplasma y estableció su residencia como un endosim-

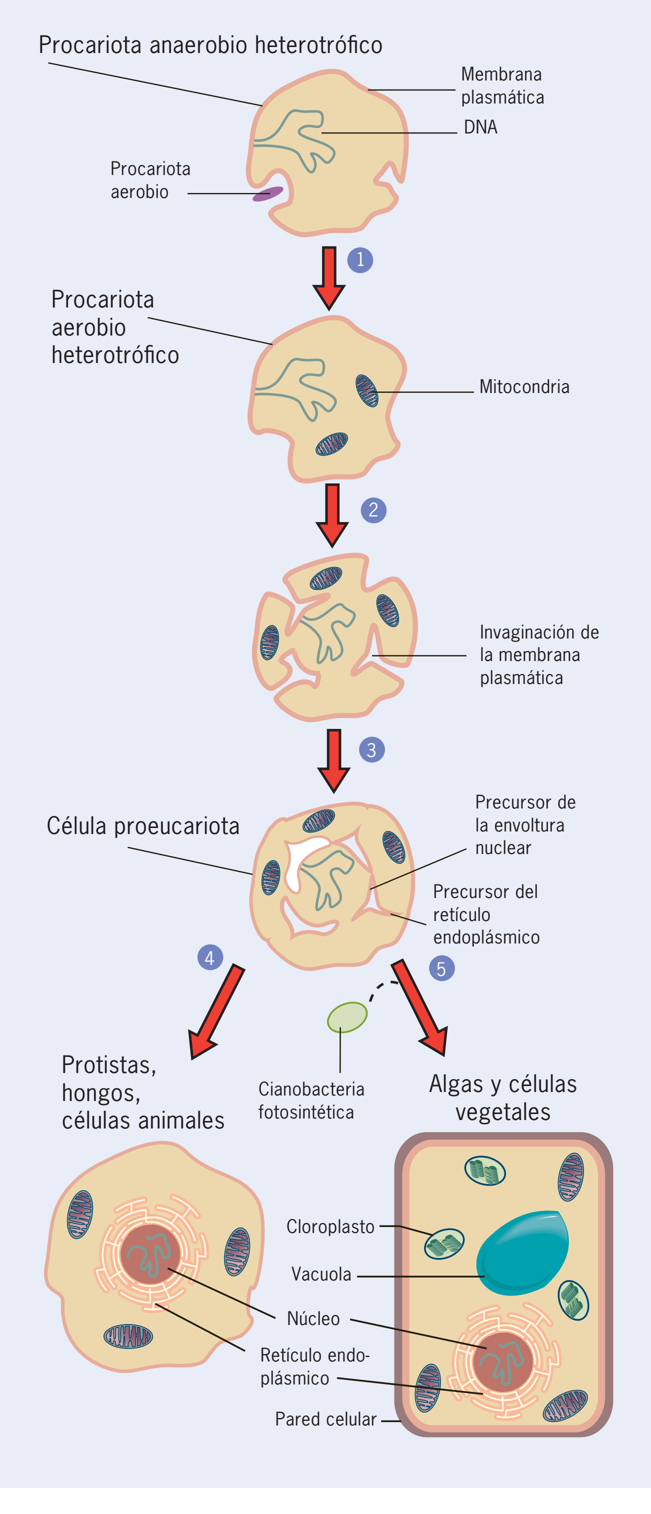


FIGURA 1 Modelo que representa los posibles pasos en la evolución de las células eucariotas, incluido el origen de las mitocondrias y los cloroplastos por endosimbiosis. En el paso 1, un gran procariota anaerobio y heterotrófico capta a un procariota aerobio pequeño. Existe fuerte evidencia que indica que el procariota fagocitado fue un ancestro de las rickettsias actuales, un grupo de organismos que son causantes del tifo y otras enfermedades. En el paso 2, el endosimbionte aeróbico evolucionó a una mitocondria. En el paso 3, una porción de la membrana plasmática se ha invaginado y formado el precursor de la envoltura nuclear y el retículo endoplásmico adjunto. El eucariota primitivo que se muestra en el paso 3 da lugar a dos grandes grupos de eucariotas. En una vía (paso 4), el eucariota primitivo evoluciona a los organismos no fotosintéticos, como los protistas, hongos y células animales. En la otra vía (paso 5), el eucariota primitivo capta un procariota fotosintético, el cual fue un endosimbionte que evolucionó a cloroplasto. (Nota: la fagocitosis del endosimbionte del paso 1 sucedió después del desarrollo de algunas de las membranas internas, pero existe evidencia que sugiere que éste fue un paso temprano en la evolución de los eucariotas.)

bionte permanente. Cuando la célula hospedadora se reprodujo, el endosimbionte también lo hizo y de esa forma una colonia de células compuestas se generó con rapidez. Después de muchas generaciones, los endosimbiontes perdieron diferentes características, que no fueron indispensables para la supervivencia, y así los microbios que un día tuvieron respiración independiente del oxígeno evolucionaron a los precursores de las mitocondrias actuales (paso 2, fig. 1).

Como se describió, una célula cuyos ancestros se formaron por medio de sucesos simbióticos secuenciales, pudo generar una línea de células que evolucionaron con otras características básicas a partir de las células eucariotas, incluido un sistema de membranas (membrana nuclear, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, lisosomas), un citoesqueleto complejo y una división celular parecida a la mitosis. Se ha propuesto que estas características aparecieron por medio de un proceso de evolución gradual más que en un solo paso, como se cree que sucedió en la adquisición del endosimbionte. Por ejemplo, el retículo endoplásmico y las membranas nucleares pudieron derivar de alguna porción de la membrana plasmática externa de la célula que se internalizó y se transformó en un tipo de membrana diferente (paso 3, fig. 1). La célula que desarrolló estos compartimientos internos diferentes debió ser el ancestro de una célula eucariota heterotrófica, como una célula de hongo o protista (paso 4, fig. 1). Se pensó que en los fósiles más antiguos se encontraban restos eucariotas que datan desde unos 1 800 millones de años.

Se ha propuesto que la adquisición de otro endosimbionte, de manera específica una cianobacteria, convirtió a un eucariota heterotrófico temprano en el ancestro de los eucariotas fotosintéticos: las algas verdes y las plantas (paso 5, fig. 1). La adquisición de los cloroplastos (hace alrededor de mil millones de años) tal vez fue uno de los últimos pasos en la secuencia del proceso de endosimbiosis debido a que estos organelos sólo están presentes en plantas y algas. Sin embargo, todos los grupos de eucariotas conocidos: a) tienen mitocondrias o b) muestran evidencia definitiva de que han evolucionado a partir de organismos que poseen estos organelos.[a]

La división de los organismos vivos en dos categorías, procariotas y eucariotas, muestra una dicotomía básica en la estructura celular, pero no marca una distinción filogenética precisa, esto es, que refleje la relación evolutiva entre los organismos vivos. ¿Cómo se determinan las relaciones evolutivas entre los organismos que se separaron en el tiempo por miles de millones de años en la forma de organismos procariotas y eucariotas? La mayoría de los métodos taxonómicos que se aplican para clasificar a los organismos de manera importante se basa en las características estructurales y fisiológicas. En 1965, Emile Zuckerkandl y Linus Pauling propusieron una conducta diferente basada en la comparación de la estructura de moléculas informativas (proteínas y ácidos nucleicos) de los organismos vivos.[3] Las diferencias entre organismos que se basan en la secuencia de los aminoácidos que conforman una proteína o la secuencia de nucleótidos que forman parte de un ácido nucleico son el resultado de alteraciones en el DNA que heredaron a las descendencias. Se calcula que las mutaciones se pueden acumular en un gen con una frecuencia constante durante largos periodos. Por lo tanto, las comparaciones de secuencias de aminoácidos o nucleótidos pueden utilizarse para determinar la forma en que los organismos se relacionan de modo estrecho. Por ejemplo, dos organismos vinculados de forma cercana, esto es, que se separaron recientemente desde un ancestro común, deberían tener mínimas diferencias en un gen en particular en comparación con dos organismos relacionados de manera distante, lo que significa que no tienen un ancestro común. Por medio de esta información que se obtiene de la secuencia como un "reloj evolutivo", los investigadores pueden construir árboles filogenéticos que muestran vías propuestas por las cuales los diferentes grupos de organismos vivos llegaron a diverger en el curso de la evolución.

A mediados de la década de 1970, Carl Woese y colaboradores de la *University of Illinois* iniciaron una serie de estudios en organismos diferentes, tras comparar la secuencia de nucleótidos de la molécula del RNA que forma parte de la subunidad pequeña del ribosoma. Este RNA, que se conoce como rRNA 16S en procariotas o rRNA 18S en eucariotas, se seleccionó porque es muy abundante en las células, es fácil purificarlo y cambia con lentitud a lo largo del tiempo durante la evolución, lo que significa que puede utilizarse para estudiar la relación de organismos relacionados de manera muy distante. Existía una desventaja principal: la secuenciación de los ácidos nucleicos era muy laboriosa y los métodos requerían mucho tiempo. En su metodología purificaron el rRNA 16S de una fuente en particular, después sometieron la preparación al efecto de la enzima ribonucleasa T1, la cual digiere a la molécula en fragmentos pequeños llamados oligonucleótidos. Los oligonucleótidos de la mezcla se separaron por electroforesis bidimensional para producir una "huella" en dos dimensiones como se muestra en la figura 2. Ya separadas las moléculas, se determinó la secuencia nucleotídica de cada uno de los oligonucleótidos y se comparó con la secuencia de diferentes organismos. En uno de sus primeros estudios, Woese y colaboradores analizaron el rRNA 16S de los ribosomas de cloroplastos del protista fotosintético Euglena.[4] Encontraron que la secuencia del rRNA del cloroplasto se asemejó mucho más a la secuencia del rRNA 16S presente en los ribosomas de las cianobacterias que su contraparte en los ribosomas citoplásmicos de los organismos eucariotas. Este hallazgo representó una sólida evidencia de que el origen simbiótico de los cloroplastos proviene de las cianobacterias.

En 1977, Woese y George Fox publicaron un artículo notable sobre el estudio de la evolución molecular.[5] Compararon la secuencia nucleotídica del rRNA de una pequeña subunidad que habían purificado de 13 especies diferentes de organismos procariotas y eucariotas. Los datos de la comparación de todas las parejas posibles de estos organismos se muestran en el cuadro 1. Los números de la parte superior del cuadro identifican a los organismos y corresponden a los números del margen izquierdo del cuadro. Cada valor en el cuadro refleja la similitud en secuencia entre los rRNA de dos organismos que se comparan: el valor inferior refleja menor similitud entre las dos secuencias. Detec-

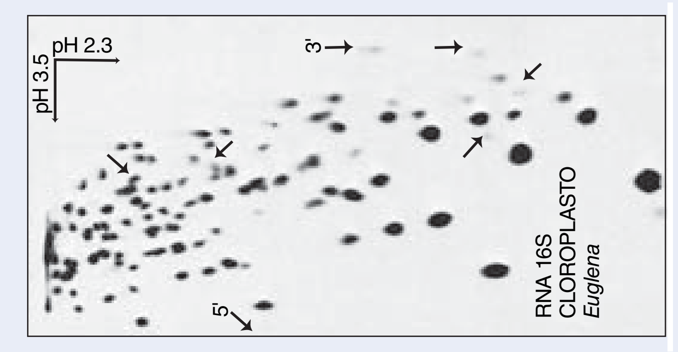


FIGURA 2 Electroforesis bidimensional que muestra la "huella" de un RNA ribosomal 16S de cloroplasto digerido con la enzima T1. Los fragmentos de RNA se sometieron a electroforesis en una dirección bajo un pH de 3.5 y a su vez en una segunda dirección a un pH de 2.3. (Tomada de L.B. Zablen, et al., Proc Nat'l Acad Sci USA 72:2419, 1975.)

[a] Existen algunos eucariotas unicelulares anaerobios (p. ej., el parásito intestinal *Giardia*) que carece de mitocondria. Por años, estos organismos formaron la base para la propuesta de que la endosimbiosis mitocondrial fue un suceso tardío que ocurrió después de estos grupos sin mitocondria. Sin embargo, un análisis reciente del DNA nuclear de estos organismos indica la presencia de genes que se transfirieron al núcleo desde la mitocondria, lo que sugiere que los ancestros de estos organismos perdieron este organelo en el transcurso de la evolución.

Cuadro 1 Semejanzas de la secuencia nucleótida entre miembros representativos de los tres reinos primarios

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. *Saccharomyces cerevisiae*, 18S	—	0.29	0.33	0.05	0.06	0.08	0.09	0.11	0.08	0.11	0.11	0.08	0.08
2. *Lemna minor*, 18S	0.29	—	0.36	0.10	0.05	0.06	0.10	0.09	0.11	0.10	0.10	0.13	0.08
3. Célula L, 18S	0.33	0.36	—	0.06	0.06	0.07	0.07	0.09	0.06	0.10	0.10	0.09	0.07
4. *Escherichia coli*	0.05	0.10	0.06	—	0.24	0.25	0.28	0.26	0.21	0.11	0.12	0.07	0.12
5. *Cholorbium vibrioforme*	0.06	0.05	0.06	0.24	—	0.22	0.22	0.20	0.19	0.06	0.07	0.06	0.09
6. *Bacillus firmus*	0.08	0.06	0.07	0.25	0.22	—	0.34	0.26	0.20	0.11	0.13	0.06	0.12
7. *Corynebacterium diptheriae*	0.09	0.10	0.07	0.28	0.22	0.34	—	0.23	0.21	0.12	0.12	0.09	0.10
8. *Aphanocapsa* 6714	0.11	0.09	0.09	0.26	0.20	0.26	0.23	—	0.31	0.11	0.11	0.10	0.10
9. Cloroplasto (*Lemna*)	0.08	0.11	0.06	0.21	0.19	0.20	0.21	0.31	—	0.14	0.12	0.10	0.12
10. *Methanebacterium thermoautotrophicum*	0.11	0.10	0.10	0.11	0.06	0.11	0.12	0.11	0.14	—	0.51	0.25	0.30
11. *M. ruminantium* cepa M-1	0.11	0.10	0.10	0.12	0.07	0.13	0.12	0.11	0.12	0.51	—	0.25	0.24
12. *Methanobacterium* sp., aislada en cariaco JR-1	0.08	0.13	0.09	0.07	0.06	0.06	0.09	0.10	0.10	0.25	0.25	—	0.32
13. *Methanosarcina barkeri*	0.08	0.07	0.07	0.12	0.09	0.12	0.10	0.10	0.12	0.30	0.24	0.32	—

Fuente: C.R. Woese y G.E. Fox, *Proc Nat'l Acad Sci USA* 74:5089, 1977.

taron que las secuencias se conglomeraron en tres grupos distintos que se indican en el cuadro. Es evidente que los rRNA dentro de cada grupo (números 1-3, 4-9 y 10-13) son mucho más similares entre ellos en comparación con los rRNA de otros dos grupos. El primero de los grupos que se muestra en el cuadro sólo contiene eucariotas; el segundo está formado de bacterias "típicas" (grampositivas, gramnegativas y cianobacterias), y el tercer grupo está integrado por bacterias de especies metanógenas (que producen metano). Para su sorpresa, Woese y Fox concluyeron que los organismos metanógenos "no parecen estar más vinculados con las bacterias típicas respecto de lo que están en relación con el citoplasma de los eucariotas". Estos resultados indican que los miembros de estos tres grupos representan tres líneas evolutivas que se han separado una de la otra en un estadio evolutivo muy temprano de los organismos celulares. Por consecuencia, estos investigadores asignaron estos organismos a tres reinos diferentes que denominaron urcariotas, eubacterias y arqueobacterias, una terminología que ha dividido a los procariotas en dos grupos distintos.

Investigaciones posteriores apoyan la teoría de que los procariotas pudieron dividirse en dos linajes relacionados de modo distante y esto agranda la categoría de las arqueobacterias para incluir por lo menos a otras dos, las termófilas, que viven en ambientes de alta temperatura y chimeneas submarinas, y las halófilas, que viven en lagos y océanos de alta salinidad. En 1989 se publicaron dos informes que cambiaron el árbol filogenético y sugirieron que las arqueobacterias estaban relacionadas de manera más estrecha con los eucariotas y menos con las eubacterias.[6,7] Los dos grupos de investigadores compararon la secuencia de aminoácidos de algunas proteínas presentes en una amplia variedad de organismos procariotas, eucariotas, mitocondrias y cloroplastos. Se elaboró un árbol filogenético a partir de los datos de las secuencias del RNA ribosomal, con lo que llegaron a la misma conclusión, como se muestra en la figura 3.[8] En este último artículo, Woese y colaboradores propusieron un esquema taxonómico actualizado, el cual se ha aceptado con unanimidad. En este esquema, las arqueobacterias, eubacterias y eucariotas se colocan en dominios separados, que se conocen como

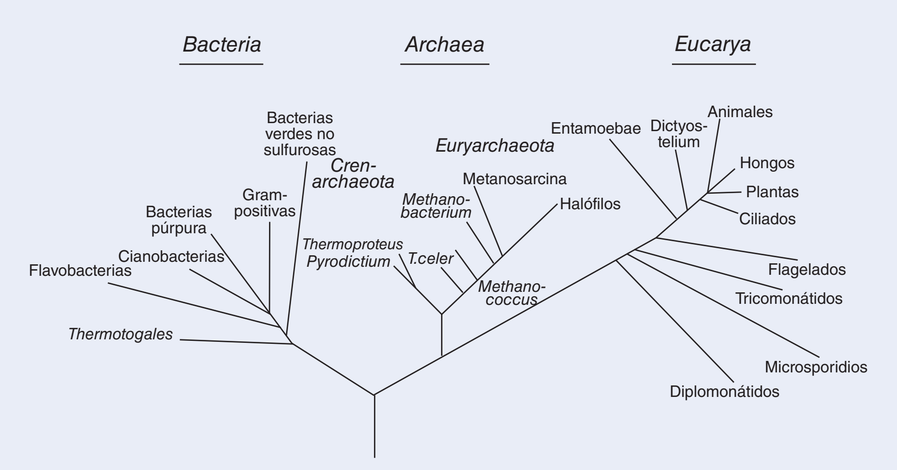


FIGURA 3 Árbol filogenético basado en la comparación de secuencias del rRNA que muestra los tres dominios de la vida. Archaea se divide en dos subgrupos, como se indica. (Tomada de C.R. Woese, et al., Proc Nat'l Acad Sci USA 87:4578, 1990.)

Archaea, Bacteria y Eucarya, respectivamente.[b] Cada dominio puede dividirse en uno o más reinos; por ejemplo, Eucarya puede separarse en los reinos tradicionales que contienen a los hongos, protistas, plantas y animales.

De acuerdo con el modelo de la figura 3, la primera división principal del árbol de la vida genera dos linajes separados, uno que lleva a Bacteria y otro que conduce a Archaea y Eucarya. Si esta visión es correcta, se trata de un miembro del linaje de arqueobacterias y no del de eubacterias, que se incluye en los simbiontes y evoluciona en una célula eucariota. Aunque el hospedador procariota en esta relación simbiótica fue tal vez una arqueobacteria, los simbiontes que evolucionaron hacia mitocondrias y cloroplastos fueron casi con toda certeza eubacterias, como lo indica su relación estrecha con los miembros modernos de este grupo.

Hasta 1995, los árboles filogenéticos del tipo mostrado en la figura 3 se basaban sobre todo en el análisis del gen que codifica el rRNA 16S-18S. Para entonces, las comparaciones filogenéticas de un grupo de otros genes sugirieron que el esquema mostrado en la figura 3 podría estar muy simplificado. Las preguntas acerca del origen de las células procariotas y eucariotas adquirieron relevancia entre 1995 y 1997 con la publicación de la secuencia completa de varios genomas procarióticos, tanto las eubacterias como las arqueobacterias y el genoma de una eucariota, la levadura *Saccharomyces cerevisiae.* Los investigadores podrían ahora comparar las secuencias de cientos de genes de manera simultánea y este análisis generará diferentes preguntas desconcertantes y volverían borrosas las líneas que diferenciaban a los tres dominios.[9] Por ejemplo, los genomas de diferentes arqueobacterias mostraron la presencia de un número significativo de genes de eubacteria. Para la mayor parte, los genes en la arqueobacteria, cuyos productos intervienen en los procesos informativos (estructura cromosómica, transcripción, traducción y replicación), fueron muy diferentes respecto de sus contrapartes en las células de eubacterias y, de hecho, se asemejaron a los genes correspondientes en las células eucariotas. Esta observación se adecuó de modo satisfactorio al esquema de la figura 3. Sin embargo, muchos de los genes en las arqueobacterias que codifican enzimas del metabolismo muestran características inconfundibles de las eubacterias.[10,11] Los genomas de especies eubacterianas también revelan evidencias de un origen mezclado, casi siempre con un número significativo de genes que portan características de arqueobacterias.[12]

Casi todos los investigadores que estudian el origen de los organismos antiguos se apoyan en la descripción básica del árbol filogenético, como el que se muestra en la figura 3 y argumentan que la presencia de genes parecidos a los de las eubacterias en las arqueobacterias y viceversa es el resultado de la transferencia de genes de unas especies a otras, un fenómeno conocido como *transferencia lateral de genes* (LGT).[13] De acuerdo con la premisa original que llevó a desarrollar el árbol filogenético de la figura 3, los genes se heredan desde un progenitor y no de un organismo próximo. Ésta es la premisa que permite a un investigador concluir que dos especies se encuentran muy relacionadas cuando ambas poseen un gen (p. ej., el gen del rRNA) de secuencia nucleotídica similar. Sin embargo, si las células pueden tomar genes de otras especies que se encuentran en su ambiente, entonces dos especies que en la actualidad no están relacionadas pueden poseer genes de secuencia muy semejantes. Un dato de la importancia de la transferencia lateral de genes en la evolución de los procariotas proviene de un estudio que comparó los genomas de dos eubacterias relacionadas, *Escherichia coli* y *Salmonella* sp. Se descubrió que 755 genes o alrededor de 20% del genoma de *E. coli* se deriva de genes "extranjeros" transferidos al genoma de *E. coli* durante los pasados 100 millones de años, tiempo en el cual dos especies pueden separarse. Estos 755 genes se adquirieron como resultado de por lo menos 234 transferencias laterales separadas de muchas fuentes diferentes.[14] (El efecto de la transferencia lateral de genes en la resistencia a los antibióticos en las bacterias patógenas se discute en la sección Perspectiva humana del cap. 3.)

Si los genomas son un mosaico de genes compuestos que provienen de fuentes diversas, ¿cómo pueden seleccionarse los genes a utilizar en el establecimiento de las relaciones filogenéticas? De acuerdo con un punto de vista, los genes que intervienen en las actividades informativas (transcripción, traducción, replicación) son los mejores objetivos para determinar las relaciones filogenéticas, debido a que estos genes son menos susceptibles a ser transferidos de manera lateral, en comparación con los genes que participan en las reacciones metabólicas.[15] Estos autores aducen que los productos de los genes informativos (p. ej., rRNA) son parte de grandes complejos cuyos componentes deben interactuar con muchas otras moléculas. Es muy raro que el producto de un gen extranjero pueda integrarse en la estructura existente. Cuando los genes "informativos" se emplean como los sujetos de comparación, las arqueobacterias y las eubacterias tienden a separarse en grupos diferentes, si bien las arqueobacterias y eubacterias tienden a agruparse juntas como parientes evolutivos, como se muestra en la figura 3.

El análisis de los genomas eucariotas ha arrojado evidencias similares de una herencia mezclada. Estudios del genoma de levaduras muestran la presencia inconfundible de genes derivados de arqueobacterias y eubacterias. Los "genes informativos" tienden a mostrar propiedades de Archaea y los "genes metabólicos" características de Eubacteria.[16] Hay diferentes explicaciones posibles para el carácter mezclado del genoma eucariótico. Las células eucariotas pudieron evolucionar a partir de ancestros de arqueobacteria y entonces tomar genes de las eubacterias con las cuales comparten el ambiente. Además, algunos de los genes en el núcleo de una célula eucariota derivan con claridad de los genes eubacterianos que se transfirieron desde el genoma de los simbiontes que evolucionaron a mitocondria y cloroplasto.[17] Un grupo de investigadores adoptó una posición más radical y propuso que el genoma eucariótico derivó originalmente de la fusión de una célula de arqueobacteria y eubacteria, seguida por la integración de sus dos genomas.[p.ej., 18] En virtud de estas rutas variadas de adquisición de genes, es evidente que un simple árbol filogenético no puede explicar la evolución del genoma completo de un organismo.[Rev. en 19, 20] En realidad, cada gen o grupo de genes de un genoma en particular puede tener su propio árbol evolutivo, lo cual quizá sea desconcertante para los que tratan de determinar el origen de los primeros ancestros.

[b] Muchos biólogos sienten desagrado por el uso de los términos, arqueobacterias y eubacterias. Pese a que estos conceptos se tomaron de la bibliografía, y se reemplazan por lo general por archaea y bacteria, muchos investigadores en este campo todavía emplean los términos formales publicados en los artículos. Debido a que éste es un capítulo introductorio de un libro de texto, se decidió continuar con la nomenclatura de arqueobacteria y eubacteria para evitar confusiones con la palabra "bacteria".

Referencias

1. SAGAN (MARGULIS), L. 1967. On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* 14:225–274.
2. MARGULIS, L. 1970. *Origin of Eukaryotic Cells.* Yale University Press.
3. ZUCKERKANDL, E. & PAULING, L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* 8:357–365.
4. ZABLEN, L. B., ET AL. 1975. Phylogenetic origin of the chloroplast and prokaryotic nature of its ribosomal RNA. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 72:2418–2422.
5. WOESE, C. R. & FOX, G. E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 74:5088–5090.
6. IWABE, N., ET AL. 1989. Evolutionary relationship of archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 86:9355–9359.
7. GOGARTEN, J. P., ET AL. 1989. Evolution of the vacuolar H^+- ATPase: Implications for the origin of eukaryotes. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 86:6661–6665.
8. WOESE, C., ET AL. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 87:4576–4579.

9. Doolittle, W. F. 1999. Lateral genomics. *Trends Biochem. Sci* 24: M5–M8 (Dec.)
10. Bult, C.J., et al. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii. Science* 273:1058–1073.
11. Koonin, E. V., et al. 1997. Comparison of archaeal and bacterial genomes. *Mol. Microbiol.* 25:619–637.
12. Nelson, K. E., et al., 1999. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima. Nature* 399:323–329.
13. Ochman, H., et al. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405:299–304.
14. Lawrence, J.G. & Ochman, H. 1998. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 95:9413–9417.
15. Jain, R., et al. 1999. Horizontal gene transfer among genomes: The complexity hypothesis. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 96:3801–3806.
16. Rivera, M. C., et al. 1998. Genomic evidence for two functionally distinct gene classes. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 95:6239–6244.
17. Timmis, J. N., et al. 2004. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes *Nature Rev. Gen.* 5:123–135.
18. Martin, W. & Müller, M. 1998. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392:37-41.
19. Walsh, D. A. & Doolittle, W. F. 2005. The real "domains" of life. *Curr. Biol.* 15:R237-R240.
20. T. M. Embley & W. Martin. 2006. Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature.* 440:623-630.

SINOPSIS

La teoría celular posee tres postulados. a) Todos los organismos están formados por una o más células; b) la célula es la unidad básica de organización de la vida, y c) todas las células proceden de células previas (pág. 2).

Las propiedades de la vida, tal y como se manifiestan en las células, se pueden describir como un conjunto de características. Las células son muy complejas, su estructura tiene un grado alto de organización y es posible predecirla. La información para crear una célula está codificada en sus genes. Las células se reproducen por división celular y el suministro de energía para realizar sus actividades se obtiene de la energía química; realizan reacciones químicas controladas por enzimas; participan en muchas actividades de tipo mecánico; reaccionan a estímulos, y tienen gran capacidad para autorregularse (pág. 3).

Las células son procariotas o eucariotas. Las primeras se encuentran en las eubacterias y arqueobacterias, aunque los restantes tipos de organismos, protistas, hongos, plantas y animales, están compuestos de células eucariotas. Las células procariotas y eucariotas comparten muchas características en común, que incluyen membrana celular semejante, un sistema similar para almacenar y utilizar información genética y rutas metabólicas parecidas. Las células procariotas son más simples, carecen de organelos del complejo membranoso (p. ej., retículo endoplásmico, aparato de Golgi, mitocondrias y cloroplastos), cromosomas y estructuras citoesqueléticas, características de las células eucariotas. Estos dos tipos de células también se pueden distinguir por sus mecanismos de división celular, sus estructuras de locomoción y el tipo de pared que producen (si acaso existiera una pared celular). Los animales y las plantas complejos contienen diferentes tipos celulares, cada uno especializado en una actividad en particular (pág. 7).

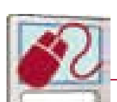
Casi todas las células tienen el mismo tamaño microscópico. De manera característica, las células bacterianas poseen una dimensión de 1 a 5 μm de largo, si bien las células eucariotas miden casi siempre 10 a 30 μm. Las células son microscópicas por razones diferentes: su núcleo posee un número limitado de copias de cada gen; el área superficial (que sirve como una superficie de intercambio celular) se convierte en un factor limitante a medida que la célula incrementa su tamaño; y la distancia entre la superficie celular y el interior llega a ser también demasiado grande para que la célula realice sus actividades mediante difusión simple (pág. 20).

Los virus son patógenos no celulares que sólo pueden reproducirse cuando se encuentran dentro de una célula viva. Fuera de la célula, los virus existen como un paquete macromolecular, también conocido como virión. Los viriones tienen diferentes formas y tamaños, pero todos consisten en ácido nucleico viral, encerrado dentro de una estructura que posee proteínas virales. Las infecciones virales pueden inducir: a) la destrucción de la célula hospedadora, acompañada de la producción de progenie viral, o b) la integración del ácido nucleico viral en el DNA de la célula hospedadora, lo que a menudo altera las actividades celulares. Los virus no se consideran organismos vivos (pág. 21).

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. Considere alguna interrogante acerca de la estructura o función celulares que son de interés. ¿Los datos requeridos para responder la pregunta serían más fáciles de obtener si se trabajara en un animal o en una planta completos o en una población de células en cultivo?, ¿cuáles serían las ventajas y desventajas en un organismo completo en comparación con un cultivo celular?
2. La figura 1-3 muestra una célula del epitelio intestinal con numerosas microvellosidades. ¿Cuál es la ventaja del organismo al poseer estas estructuras?, ¿qué esperaría que le sucediera a un individuo que pierde las microvellosidades a causa de una mutación hereditaria?
3. Las primeras células humanas que se cultivaron con éxito procedieron de un tumor maligno. ¿Cree usted que esto refleja sólo la disponibilidad de células cancerosas o que estas células son mejores para cultivo celular?, ¿por qué?
4. Las representaciones de las células vegetales y animales de la figura 1-8*b* y *c* indican ciertas estructuras presentes en las células de la planta, pero que están ausentes en las células animales. ¿Cómo piensa que cada una de estas estructuras afecta a la planta en su totalidad?
5. Se ha observado que las células poseen receptores en su superficie que reaccionan a estímulos específicos. Muchas células en el cuerpo humano tienen receptores que les permiten unir hormonas específicas que circulan en la sangre. ¿Por qué cree que estos receptores hormonales son importantes?, ¿cuál sería el efecto sobre las actividades fisiológicas del organismo si las células no tuvieran estos receptores o si todas las células tuvieran los mismos receptores?
6. Si tuviera que argüir que los virus son organismos vivos, ¿qué características de la estructura y función virales debe usted referir en sus argumentos?

7. Si se asume que las actividades dentro de la célula suceden de una manera semejante a la caricatura de Rube Goldberg de la figura 1-7, ¿en qué difieren de una actividad humana, como armar un automóvil en una línea de ensamble o encestar en un juego de baloncesto?
8. Los núcleos de las células eucariotas, diferentes respecto de las células bacterianas, están cubiertos por una doble membrana que posee poros complejos. ¿Cómo podría afectar esto el tránsito entre el DNA y el citoplasma de una célula eucariota en comparación con una célula procariota?
9. Examine la fotografía del protista ciliado de la figura 1-16 y considere algunas de las actividades en las cuales participa esta célula y en las que no participa una célula muscular o nerviosa de su propio organismo.
10. ¿Qué tipo de células alcanzaría el mayor volumen: una célula muy aplanada o una esférica?, ¿por qué?
11. Suponga que fuera usted un científico de 1890 y que estudia una enfermedad de las semillas del tabaco que retarda el crecimiento de las plantas y mancha sus hojas. Usted descubre que el extracto de una planta enferma, cuando se agrega a una planta sana, es capaz de transmitir la enfermedad a esta última. Examina el extracto en el mejor microscopio óptico de esa época y no encuentra evidencia de bacterias. Hace pasar forzadamente el lisado a través de filtros cuyos poros son tan diminutos que retardan el paso de las bacterias más pequeñas que se conocen y el líquido que pasa a través del filtro retiene la capacidad de transmitir la enfermedad. Al igual que Dimitri Ivanovsky, que realizó estos experimentos hace más de 100 años, usted quizá debería concluir que el agente infeccioso fue un tipo desconocido de bacteria pequeña y extraña. ¿Qué clase de experimentos debería realizar en la actualidad para probar esta hipótesis?
12. La mayoría de los biólogos que estudian la evolución piensa que todas las mitocondrias han evolucionado a partir de una mitocondria ancestral única y que todos los cloroplastos proceden de uno primigenio único. En otras palabras, el suceso simbiótico que dio lugar a cada uno de estos organelos ocurrió sólo una vez. Si éste es el caso, ¿a qué nivel del árbol filogenético de la figura 3, página 27, colocaría la obtención de estos organelos?
13. Hubo gran controversia en torno a la publicación de la secuencia completa del virus 1918 de la influenza y la reconstitución de partículas virales activas. Quienes respaldaban la publicación sostenían que este tipo de información podría ayudar a comprender mejor la virulencia de los virus gripales y a desarrollar mejores tratamientos contra ellos. Los que se oponían argumentaban que el virus podría ser reconstituido por bioterroristas o que existía el peligro de otra pandemia causada por la liberación accidental del virus por un investigador descuidado. ¿Cuál es su opinión sobre los méritos de realizar este tipo de investigación?



SITIO EN INTERNET www.wiley.com/college/karp

Las animaciones y los videos indicados en este capítulo pueden visitarse en el sitio de Cell and Molecular Biology de Karp en Internet. También hallará todas las respuestas a las preguntas analíticas recién planteadas, autoexámenes que le ayudarán a prepararse para los exámenes, y vínculos con fascinantes recursos. La sección lecturas adicionales que sigue se amplía en el sitio en Internet.

LECTURAS ADICIONALES

Referencias generales en microbiología y virología

Knipe, D. M., et al. 2006. *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott.

Madigan, M. T., et al. 2006. *Brock—Biology of Microorganisms*, 11th ed. Prentice-Hall.

Otras lecturas

Davis, R. H. 2004. The age of model organisms. *Nature Revs. Gen.* 5:69–76.

Embley, T. M. & Martin, W. 2006. Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* 440:623–630.

Gewin, V. 2006. Discovery in the dirt. *Nature* 439:384–386. [sequencing uncultured microbes]

Keirstead, H. S. 2005. Stem cells for the treatment of myelin loss. *Trends Neurosci*. 28:677–683.

Kolter, R. & Greenberg, E. 2006. The superficial life of microbes. *Nature* 441:300–302. [on microbial biofilms]

Lamb, R. A. & Jackson, D. 2005. Extinct 1918 virus comes alive. *Nature Med.* 11:1154–1156.

Lanza, R. & Rosenthal, N. 2004. The stem cell challenge. *Sci. Amer.* pp. 92–99. June

Miller, G. 2006. New neurons strive to fit in. *Science* 311:938–940.

Nee, S. 2004. More than meets the eye. *Nature* 429:804–805. [microbial diversity]

Smith, A., et al., 2006. Nature Insight: Reviews on stem cells. *Nature* 441:1060–1102.

Snyder, E. Y., et al., 2006. Can science resolve the ethical impasse in stem cell research? *Nature Biotech*. 24:397–400.

Taubenberger, J. K., et al., 2005. Capturing a killer flu virus. *Sci. Amer.* pp. 64–71. Jan.

Thiel, K. 2004. Old dogma, new tricks—21st century phage therapy. *Nature Biotech.* 22:31–37.

Villarreal, L. P. 2004. Are viruses alive? *Sci. Amer.* pp. 101–105. Dec.

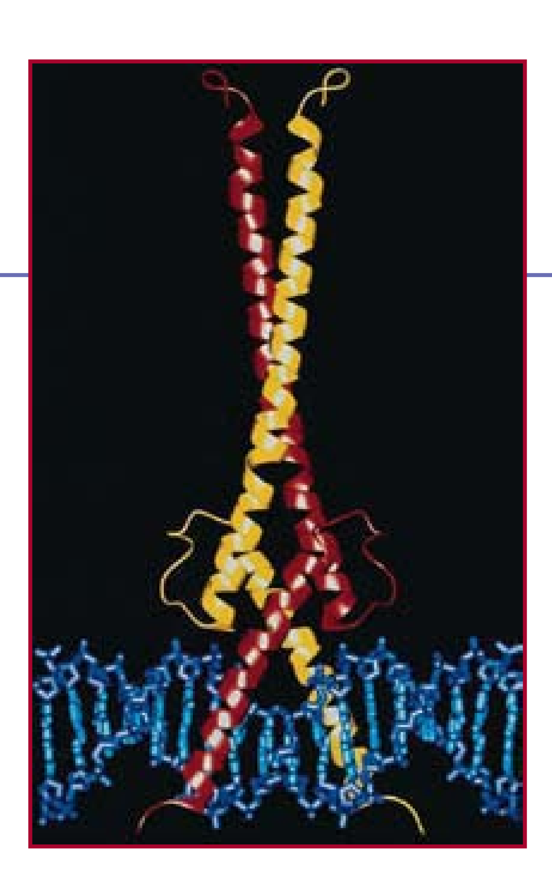
Walsh, D. A. & Doolittle, W. F. 2005. The real “domains” of life. *Curr. Biol.* 15:R237–R240.

Weissman, I. L. 2005. Politic stem cells. *Nature* 439:145–148.

Vogel, G. 2005. “Ready or not?” Human ES cells head toward the clinic. *Science* 308:1534–1538.

Zimmer, C. 2006. Did DNA come from viruses? *Science* 312:870–872.

CAPÍTULO 2



Las bases químicas de la vida

Este capítulo comienza con un breve análisis de las bases atómicas de la materia, un tema al parecer sin relación directa con un libro de texto de biología. Aun la vida se basa en las propiedades de los átomos y se regula por los mismos principios de la química y la física, al igual que otros tipos de materia. El nivel de organización de la célula sólo es un pequeño paso después del nivel atómico, como se observa al examinar la importancia de los movimientos de algunos átomos de las moléculas durante actividades como la contracción muscular o el transporte de sustancias a través de las membranas celulares. Las propiedades de las células y sus organelos derivan de forma directa de las actividades de sus moléculas. Considérese un proceso como la división celular, que puede observarse con gran detalle bajo el microscopio óptico convencional. Para comprender las actividades que ocurren cuando una célula se divide es necesario conocer, por ejemplo, los aspectos de las interacciones entre las moléculas proteicas y el DNA (ácido desoxirribonucleico) que hacen posible la condensación de los cromosomas en estructuras empaquetadas semejantes a un bastón y su separación en células diferentes; la conformación molecular de proteínas que contienen microtúbulos permite a éstas desensamblarse en un momento en la célula y ensamblarse en otra localización diferente; además, hace posible que las propiedades de los lípidos le confieran a la membrana celular externa su plasticidad, de manera que pueda desplazarse hasta el centro de la célula y dividirla en dos partes. Es imposible comenzar a comprender la fisiología celular sin un conocimiento razonable de la estructura y propiedades de los tipos principales de moléculas biológicas. El objetivo del presente capítulo es: proporcionar la información necesaria acerca de la

Un complejo formado entre dos macromoléculas diferentes. Una porción de una molécula de DNA (que se muestra en azul) forma un complejo con una proteína integrada por dos subunidades polipeptídicas, una en rojo y la otra en amarillo. Las partes de la proteína que se insertan en los surcos del DNA han detectado y unido una secuencia específica de nucleótidos en la molécula de ácido nucleico. (Cortesía de A. R. Ferré-D'Amaré y Stephen K. Burley.)

química de la vida para permitir al lector comprender las bases de la vida. Primero se analizan los tipos de enlaces que pueden formarse entre los átomos.

2.1 ENLACES COVALENTES

Los átomos que conforman una molécula se encuentran unidos por medio de **enlaces covalentes** donde pares de electrones se comparten entre pares de átomos. La formación de enlaces covalentes entre dos átomos se rige por el principio fundamental según el cual un átomo es más estable cuando su capa electrónica más externa se ocupa por completo. Por lo tanto, el número de enlaces que un átomo puede formar guarda relación directa con el número de electrones necesarios para completar la capa externa.

La estructura electrónica de algunos átomos se representa en la figura 2-1. La órbita externa (única) de los átomos de hidrógeno o helio se llena cuando posee dos electrones; la órbita externa de otros átomos que se muestran en la figura 2-1 se completa cuando tienen ocho electrones. De esta manera, un átomo de oxígeno con seis electrones en su capa externa puede completar esta órbita al combinarse con dos átomos de hidrógeno y formar una molécula de agua. El átomo de oxígeno se une a cada átomo de hidrógeno por medio de un enlace covalente *simple* (representado como H:O o H—O). En la formación de un enlace covalente se libera energía que luego debe reabsorberse cuando se rompe el enlace. La energía requerida para romper los enlaces covalentes C—H, C—C o C—O es muy alta, por lo general entre 80 y 100 kilocalorías por mol (kcal/mol)[1] de moléculas, y ello crea la estabilidad de estos enlaces en la mayoría de las condiciones.

[1] Una caloría es la cantidad de energía térmica requerida para aumentar un grado centígrado la temperatura de un gramo de agua. Una kilocaloría (kcal) es igual a 1 000 calorías. También la energía puede expresarse en julios, una cuantificación utilizada de manera histórica para medir la energía en forma de trabajo. Una kilocaloría es igual a 4 186 julios. En cambio, 1 julio = 0.239 calorías. Un mol es igual al número de Avogadro (6×10^{23}) de moléculas. Un mol de una sustancia es su peso molecular expresado en gramos.

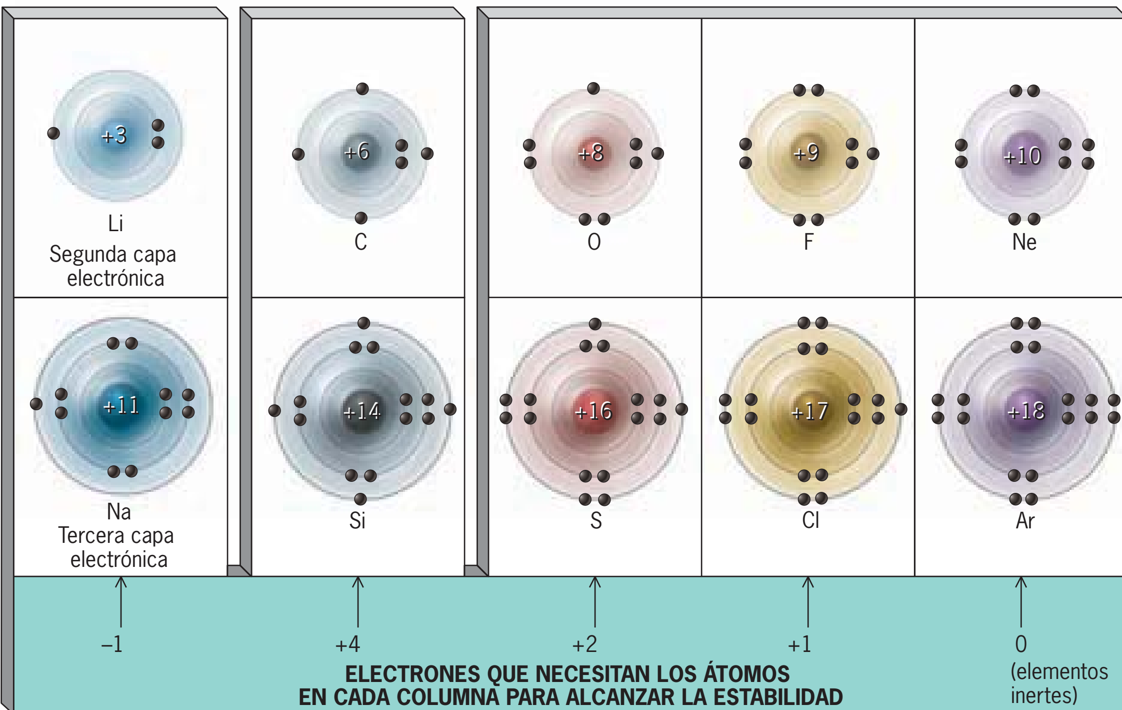


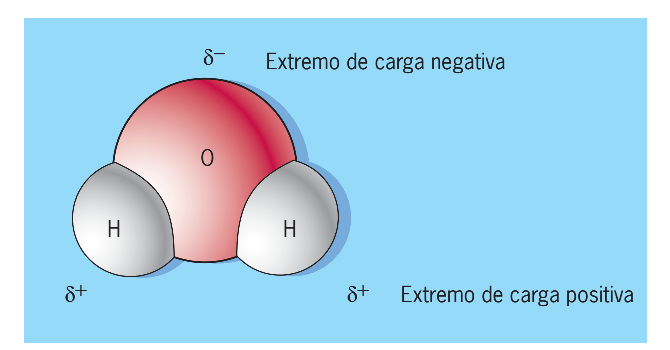
FIGURA 2-1 Representación gráfica del ordenamiento de electrones en algunos átomos comunes. Los electrones están presentes alrededor del núcleo del átomo en "nubes" u *órbitas*, definidos por sus enlaces que pueden tener una forma esférica o en mancuerna. Cada órbita contiene un máximo de dos electrones porque los electrones (puntos oscuros en la figura) están agrupados en pares. La órbita más interna es simple (por tanto, dos electrones), la segunda órbita tiene cuatro órbitas (ocho electrones), la tercera también cuatro órbitas, y así de modo sucesivo. El número de electrones de la capa externa determina sobre todo las propiedades químicas de un elemento. Los átomos con un número similar de electrones en la órbita externa tienen propiedades similares. El litio (Li) y el sodio (Na), por ejemplo, poseen un electrón en la órbita externa y ambos son metales muy reactivos. Los átomos de carbono (C) y silicio (Si) pueden cada uno unirse con cuatro átomos diferentes. Sin embargo, en virtud de su tamaño, un átomo de carbono puede unirse a otros átomos de carbono y crear moléculas orgánicas de cadenas largas, en tanto que el silicio no es capaz de formar moléculas comparables. El neón (Ne) y el argón (Ar) tienen completa su órbita externa, lo que hace a estos átomos apenas reactivos (se los conoce como gases inertes).

En muchos casos, dos átomos pueden unirse por medio de enlaces en los que se comparte más de un par de electrones. Si se comparten dos pares de electrones, como sucede en la molécula de oxígeno (O_2), el enlace covalente es un *enlace doble* y, si es el caso de tres pares de electrones (como en una molécula de nitrógeno, N_2), se trata de un *enlace triple*. No se sabe que existan enlaces cuádruples. El tipo de enlace entre los átomos tiene consecuencias importantes en la determinación de la forma de las moléculas. Por ejemplo, los átomos unidos por un enlace simple son capaces de rotar uno en relación con el otro, aunque los átomos con dobles (y triples) enlaces no tienen esta capacidad. Como se muestra en la figura 6-6, los enlaces dobles pueden funcionar como centros de captación de energía, activados por procesos vitales como la respiración y la fotosíntesis.

Cuando los átomos son del mismo elemento, como en el H_2, el par de electrones de la última órbita se comparten entre los dos átomos unidos. Sin embargo, cuando dos átomos diferentes se unen de manera covalente, el núcleo de un átomo con carga positiva ejerce mayor fuerza de atracción sobre los electrones externos del otro. En consecuencia, los electrones compartidos tienden a localizarse más próximos al átomo de mayor fuerza de atracción, es decir, al **átomo más electronegativo**. Entre los átomos presentes con más frecuencia en las moléculas biológicas el nitrógeno y el oxígeno son mucho más electronegativos.

Moléculas polares y no polares

Considérese el caso de una molécula de agua. Los átomos de oxígeno del agua atraen a los electrones con mayor fuerza que los átomos de hidrógeno. Como resultado, se dice que los enlaces O—H de la molécula de agua están *polarizados*, de manera que uno de los átomos tiene carga parcial negativa y el otro tiene carga parcial positiva. Por lo general, esto se expresa de la manera siguiente:



Las moléculas, como la del agua, con distribución asimétrica de la carga eléctrica (o *dipolo*), se conocen como moléculas **polares**. Las moléculas polares de importancia biológica contienen uno o más átomos electronegativos, casi siempre O, N, S o éstos y P. Cuando las moléculas no poseen átomos electronegativos y enlaces polarizados, como sucede con las moléculas que están constituidas de átomos de carbono e hidrógeno, se dice que son **no polares**. La presencia de enlaces muy polarizados es de extrema importancia para determinar la reactividad de las moléculas. Las moléculas no polares grandes, como las ceras y las grasas, tienden a ser relativamente inertes. Algunas de las moléculas biológicas más interesantes, incluidas las proteínas y los fosfolípidos (que se revisan más adelante), contienen regiones polares y no polares que actúan de manera muy diferente.

Ionización

Algunos átomos son tan electronegativos que pueden capturar electrones de otros átomos durante una reacción química. Por ejemplo, cuando los elementos como el sodio (un metal plateado) y el cloro (un gas tóxico) se mezclan, el único electrón en la capa más externa de cada átomo de sodio se desplaza a la capa más externa del átomo de cloro deficiente en un electrón. Como consecuencia, estos dos elementos se transforman en átomos cargados, es decir, **iones**.

$$2Na\cdot + :\ddot{\underset{..}{Cl}}:\ddot{\underset{..}{Cl}}: \rightarrow 2Na:\ddot{\underset{..}{Cl}}: \rightarrow 2Na^+ + 2:\ddot{\underset{..}{Cl}}:^-$$

Puesto que el ion cloro posee un electrón adicional (en relación con el número de protones de su núcleo), éste tiene una carga negativa (Cl^-) y se denomina **anión**. El átomo de sodio, que ha perdido un electrón, posee una carga positiva adicional (Na^+) y se llama **catión**. Cuando se presentan en cristales, estos iones forman cloruro de sodio o sal de mesa común.

Los iones de Na^+ y Cl^- mencionados antes son relativamente estables porque sus capas más externas están completas. Una disposición diferente de electrones dentro de un átomo puede generar especies muy reactivas conocidas como *radicales libres*. La estructura de los radicales libres y su importancia en biología se consideran en la sección Perspectiva humana.

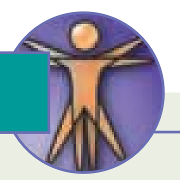
REVISIÓN

1. Los átomos de oxígeno tienen ocho protones en su núcleo. ¿Cuántos electrones poseen?, ¿cuántos órbitales se encuentran en su capa de electrones interna?, ¿cuántos electrones se hallan en su capa más externa? y ¿cuántos electrones puede recibir la última órbita antes de completarse?
2. Compare: un átomo de sodio y un ion de sodio; un doble enlace y uno triple; un átomo de baja electronegatividad y uno de alta; la distribución de electrones alrededor de un átomo de oxígeno unido a otro de oxígeno y un átomo de oxígeno unido a dos de hidrógeno.

2.2 ENLACES NO COVALENTES

Los enlaces covalentes son uniones muy fuertes establecidas entre los átomos que conforman una molécula. Las interacciones entre las moléculas (o entre partes diferentes de una molécula biológica grande) se establecen por diferentes uniones débiles llamadas enlaces no covalentes. Los **enlaces no covalentes** no dependen de electrones compartidos, sino de las fuerzas de atracción entre los átomos de cargas opuestas. Los enlaces no covalentes individuales son débiles (1 a 5 kcal/mol) y por lo tanto se rompen con rapidez y se forman de nueva cuenta. Como se observa en este libro, esta característica permite que los enlaces no covalentes intervengan en las interacciones dinámicas entre las moléculas de la célula.

PERSPECTIVA HUMANA



Radicales libres como causa de envejecimiento

¿Por qué los seres humanos tienen un máximo de vida de unos 100 años en comparación con las especies más cercanas, como el chimpancé, que viven casi la mitad de ese tiempo? Muchos biólogos piensan que el envejecimiento proviene de una acumulación gradual de daño en los tejidos corporales. Quizá el DNA padezca la alteración más destructiva. Las modificaciones del DNA llevan a la generación de mensajes genéticos erróneos que promueven la degeneración celular gradual. ¿Qué hace que suceda el daño celular y por qué ocurre en menos tiempo en el chimpancé en comparación con el ser humano? La respuesta puede residir en el nivel atómico.

Los átomos se estabilizan cuando sus capas están saturadas de electrones. Las capas electrónicas poseen órbitas, cada una de las cuales puede tener no más de dos electrones. Los átomos o las moléculas que poseen órbitas con un solo electrón no pareado tienden a ser muy inestables, y se conocen como **radicales libres**. Los radicales libres pueden formarse cuando se rompen los enlaces covalentes, de tal forma que cada porción se queda con una mitad de los electrones compartidos; también se generan cuando un átomo o molécula acepta un solo electrón transferido durante una reacción de oxidorreducción. Por ejemplo, el agua puede convertirse en radicales libres cuando se expone a la radiación solar:

$$H_2O \rightarrow \underset{\text{radical hidroxilo}}{HO\cdot} + H\cdot$$

("•" indica un radical libre)

Los radicales libres son en extremo reactivos y pueden alterar de manera química muchos tipos de moléculas, entre ellas proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. La formación de radicales hidroxilo tal vez sea una de las razones principales de que la luz solar sea tan nociva para la piel.

En 1956, Denham Harman, de la *University of Nebraska*, propuso que el envejecimiento era el resultado del daño a los tejidos producido por los radicales libres. Puesto que el tema de los radicales libres no era familiar para los biólogos y los médicos, la propuesta no suscitó gran interés. Después, en 1969, Joe McCord e Irwin Fridovich, de la *Duke University* descubrieron una enzima, la dismutasa de superóxido (SOD), cuya única función es destruir radicales libres ($O_2\cdot^-$), un tipo de radical libre formado cuando el oxígeno molecular capta un electrón adicional. La SOD cataliza la siguiente reacción:

$$O_2\cdot^- + O_2\cdot^- + 2H^+ \rightarrow \underset{\text{peróxido de hidrógeno}}{H_2O_2} + O_2$$

El peróxido de hidrógeno es una sustancia oxidante muy reactiva, por lo que se usa como desinfectante y agente blanqueador. Si no se destruye con rapidez, el H_2O_2 puede transformarse y formar radicales hidroxilo que atacan a las macromoléculas de la célula. En condiciones normales, el peróxido de hidrógeno se destruye en la célula por medio de la enzima catalasa o la peroxidasa de glutatión.

Investigaciones posteriores revelaron que los radicales superóxido se forman dentro de las células durante el metabolismo oxidativo normal y que una dismutasa de superóxido está presente en las células de diferentes organismos, desde las bacterias hasta los seres humanos. De hecho, los animales poseen tres versiones diferentes (isoformas) de la SOD: una citosólica, otra mitocondrial y una extracelular. Se estima que 1 a 2% del oxígeno que capta la mitocondria humana se puede convertir en peróxido de hidrógeno en lugar de convertirse en agua, que es el producto normal de la respiración. La importancia de la SOD es más evidente en estudios de mutantes de bacterias y levaduras que carecen de esta enzima; estas células no pueden crecer en presencia de oxígeno. De manera similar, los ratones que no tienen la versión mitocondrial de la enzima (SOD2) son incapaces de sobrevivir más de una semana después del nacimiento. A la inversa, los ratones manipulados genéticamente de modo que sus mitocondrias contengan altas concentraciones de la enzima catalasa (que destruye H_2O_2), viven 20% más que los testigos no tratados. Este descubrimiento, del que se informó en 2005, constituye la primera demostración de que mejores defensas antioxidantes pueden incrementar el lapso de vida de un mamífero.

A pesar de que no se discute el gran poder destructivo de los radicales libres como el superóxido y los radicales hidroxilo, la importancia de estos agentes como un factor en el envejecimiento es motivo de controversia. La hipótesis de Harman referente a los radicales libres y el envejecimiento tiene algunas predicciones. Por ejemplo, sería previsible que los animales con gran longevidad generen pocos radicales libres, posean gran capacidad para eliminar los radicales libres o tengan una capacidad superior para reparar los daños celulares infligidos por los radicales libres. Estos argumentos han recibido el apoyo de estudios recientes en los que se ha estudiado el crecimiento de los fibroblastos de ratón y seres humanos en cultivo bajo condiciones convencionales de oxígeno (20%) y niveles de oxígeno reducido (3%). Los fibroblastos de ratón (células de tejido conjuntivo) que crecen en condiciones de bajos niveles de oxígeno experimentan lesiones tan sólo un tercio más en el DNA y presentan mucho más divisiones celulares antes del término de la división que los fibroblastos en las condiciones adecuadas de oxígeno. Los fibroblastos de ratón cultivados en 20% de oxígeno sufren tres veces más daño oxidativo en el DNA que los fibroblastos humanos cultivados bajo estas condiciones. Se ha observado que las células humanas poseen mayor capacidad para prevenir o reparar el daño oxidativo del DNA.

El tiempo de vida de los mamíferos puede incrementarse si se restringen de manera estricta las calorías de la dieta. Como se demostró al principio en la década de 1930, los ratones mantenidos en condiciones de restricción de calorías vivieron por lo regular de 30 a 40% más que las camadas alimentadas con el contenido común de calorías. Estudios de la velocidad metabólica de estos ratones han arrojado resultados contradictorios, pero existe un consenso general acerca de que los animales alimentados con bajos contenidos calóricos tienen una marcada disminución de $O_2\cdot^-$ y H_2O_2, lo cual puede explicar su longevidad tan marcada. Estudios prospectivos que abarcan largos periodos se realizan en monos para observar si pueden vivir más años y más sanos alimentados con dietas restringidas en calorías. Sin embargo, no ha pasado el tiempo suficiente para determinar si los animales han maximizado su tiempo de vida (por lo general de unos 40 años); los estudios preliminares notifican bajos niveles de glucosa, insulina y triglicéridos en sangre y sugieren que estos animales tienen menos probabilidades de padecer alteraciones relacionadas con la edad como diabetes y enfermedad arterial coronaria. Los niveles bajos de insulina en sangre parecen ser un factor importante en la promoción de la longevidad; los estudios en nematodos y moscas de la fruta indican que al reducir la actividad de las hormonas semejantes a la insulina se puede incrementar la longevidad de estos invertebrados.

Un área relacionada es la investigación de sustancias conocidas como antioxidantes que son capaces de destruir los radicales libres. La venta de estas sustancias constituye una fuente importante de utilidades para la industria de las vitaminas y los suplementos alimenticios. Los antioxidantes que se encuentran en el organismo incluyen al glutatión, las vitaminas E y C y el beta caroteno (el color naranja de las zanahorias y otros vegetales). A pesar de que estas sustancias proveen un gran beneficio en la dieta debido a su capacidad para destruir radicales libres, los estudios en ratas y ratones no han suministrado evidencias de que retarden el envejecimiento o incrementen la vida de estos organismos.

Un antioxidante que recibe considerable atención es el reservatrol, un compuesto polifenólico presente en altas concentraciones en la corteza de las uvas rojas. Existe la creencia ampliamente difundida de que el reservatrol es la causa de los beneficios para la salud atribuidos al vino tinto. En vez de eliminar radicales libres, al parecer dicha sustancia actúa estimulando una enzima (Sir2) que tiene una participación importante en promover la longevidad.

Aunque de manera individual los enlaces no covalentes son débiles, cuando gran número de éstos actúa en conjunto, como sucede entre las dos cadenas sencillas de una molécula de DNA o entre las diferentes partes de una proteína, sus fuerzas de atracción son aditivas. Tomados como un todo, los enlaces no covalentes proveen a las estructuras gran estabilidad. Se describen diferentes tipos de enlaces no covalentes que son esenciales para la célula.

Enlaces iónicos: atracción entre átomos cargados

Un cristal o grano de sal de mesa se mantiene unido por atracciones electrostáticas entre los iones de Na^+ con carga positiva y los iones de Cl^- con carga negativa. Este tipo de atracción entre componentes completamente cargados se conoce como **enlace iónico** (o *puente salino*). Los enlaces iónicos en un grano de sal pueden ser muy fuertes. Sin embargo, si el grano de sal se disuelve en agua, cada uno de los iones individuales se rodea de moléculas de agua que impiden la aproximación de los iones con carga opuesta para formar uniones iónicas (fig. 2-2). Debido a que las células están formadas sobre todo por agua, los enlaces entre los iones *libres* son de importancia mínima. En cambio, los enlaces iónicos débiles entre los grupos de carga opuesta de las moléculas biológicas grandes son de gran relevancia. Por ejemplo, cuando los átomos de fosfato de carga negativa que son parte de una molécula de DNA se vinculan de modo estrecho con los grupos de carga positiva de la superficie de una proteína (fig. 2-3), los enlaces iónicos entre éstos ayudan a mantener articulado el complejo. La fuerza iónica en una célula casi siempre es débil (alrededor de 3 kcal/mol) debido a que hay agua, pero en la parte interna de una proteína, donde no se permite la presencia del agua, estos enlaces pueden tener gran influencia.

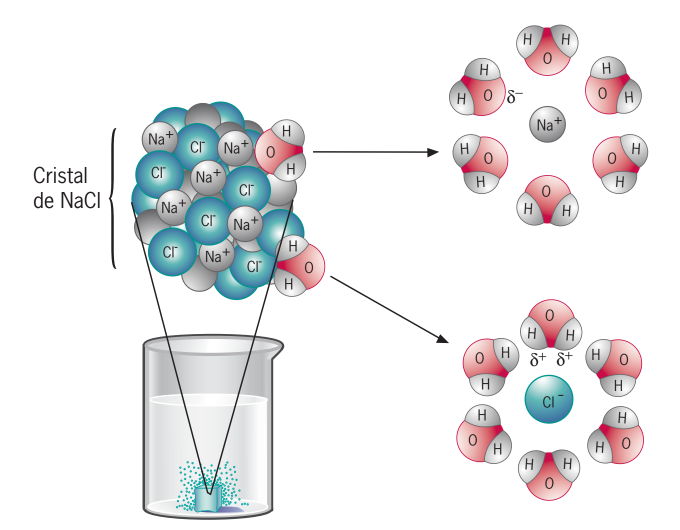


FIGURA 2-2 Disolución de un cristal de sal. Cuando se coloca en agua un cristal de sal, los iones Na^+ y Cl^- se rodean de moléculas de agua y se rompe el enlace iónico entre los dos iones. A medida que la sal se disuelve, los átomos de oxígeno con carga negativa de las moléculas de agua se conectan con los iones de sodio de carga positiva y los átomos de hidrógeno de carga positiva de las moléculas de agua se adhieren a los iones cloruro cargados de manera negativa.

Puentes de hidrógeno

Cuando un átomo de hidrógeno se une de manera covalente a un átomo electronegativo, en particular al átomo de oxígeno o nitrógeno, el único par de electrones compartidos es desplazado con una gran fuerza hacia el núcleo del átomo electronegativo, lo cual deja una carga parcial positiva al átomo de hidrógeno. Por consiguiente, el núcleo desnudo del átomo de hidrógeno, con carga positiva, puede aproximarse lo suficiente para establecer una interacción de atracción con el par de electrones externos no compartidos de un segundo átomo electronegativo (fig. 2-4). Esta atracción débil recíproca se conoce como **enlace** o **puente de hidrógeno**.

Los puentes de hidrógeno se forman entre las moléculas con mayor polaridad y son en particular importantes en la determinación de la estructura y propiedades del agua (se discute más adelante). Estos puentes también se forman entre los grupos polares presentes en las moléculas biológicas grandes, como los que se forman entre las dos cadenas sencillas de la molécula del DNA (véase fig. 2-3). Dado que su fuerza es aditiva, el gran número de puentes de hidrógeno que se establece entre las cadenas sencillas del DNA le permiten mantener estable su estructura de doble hélice. Sin embargo, como sus puentes de hidrógeno individuales son débiles (2 a 5 kcal/mol), la doble cadena puede separarse de manera parcial y permitir el acceso de enzimas a las cadenas sencillas de la molécula del DNA.

Interacciones hidrófobas y fuerzas de van der Waals

A causa de su capacidad para interactuar con el agua, las moléculas polares, como los azúcares y los aminoácidos (que en breve se describen), se dice que son **hidrófilos**, o "amantes del agua". Las moléculas no polares, como los esteroides o las grasas, prácticamente son insolubles en agua debido a que carecen de regiones con carga atraíbles hacia los polos de las moléculas de agua. Cuando los compuestos no polares se mezclan con el agua,

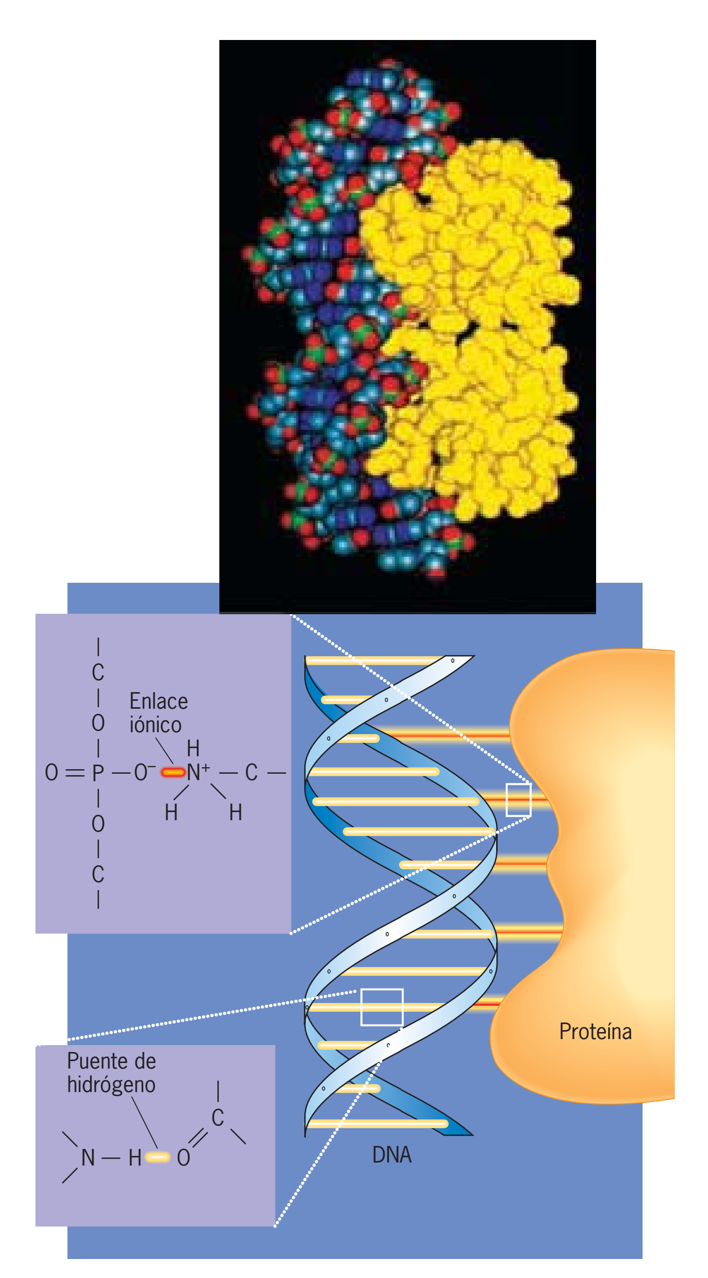


FIGURA 2-3 **Los enlaces iónicos no covalentes** juegan un papel importante en la interacción de una molécula de proteína, a la derecha (átomos de color amarillo), con la molécula de DNA, a la izquierda. Los enlaces iónicos se forman entre los átomos de nitrógeno cargados de modo positivo en la proteína y los átomos de oxígeno cargados de forma negativa en el DNA. La molécula de DNA consiste en dos cadenas separadas pero unidas por puentes de hidrógeno no covalentes. Aunque un enlace no covalente sencillo es relativamente débil y se rompe con facilidad, un gran número de tales enlaces entre estas dos moléculas, como entre las dos cadenas de DNA, suministra al complejo gran estabilidad. (Imagen superior cortesía de Stephen Harrison.)

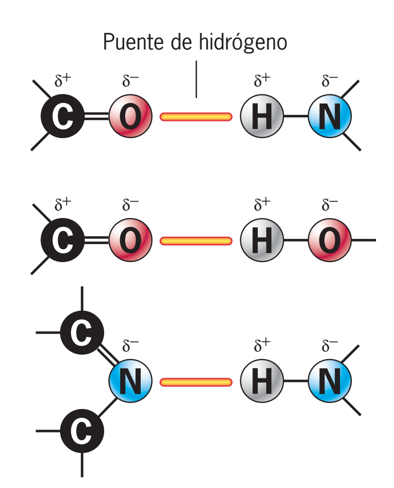


FIGURA 2-4 **Puentes de hidrógeno** formados entre un átomo electronegativo enlazado, como el nitrógeno o el oxígeno, que posee una carga parcial negativa, y un átomo de hidrógeno enlazado, que tiene una carga parcial positiva. Los puentes de hidrógeno (de 0.18 nm) son casi el doble de los enlaces covalentes más fuertes.

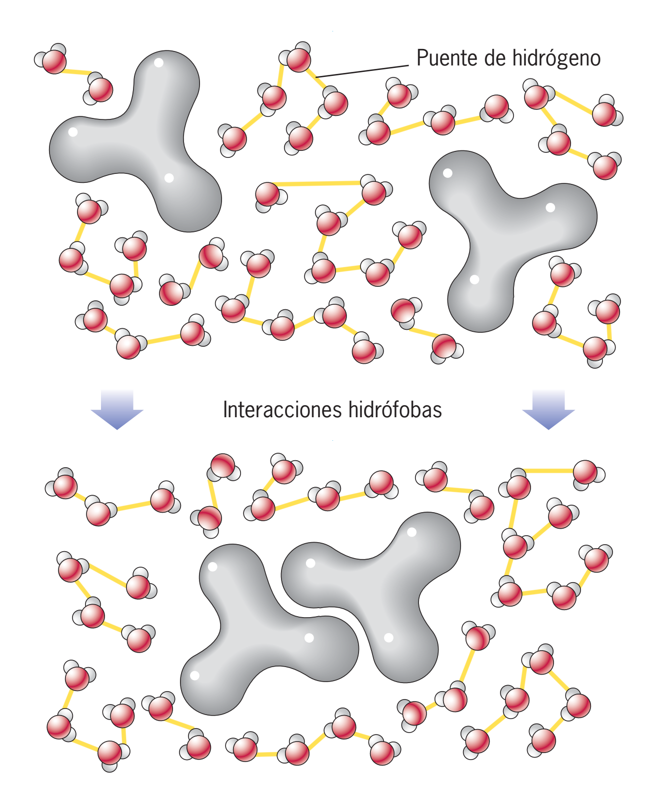


FIGURA 2-5 **En una interacción hidrófoba,** las moléculas no polares (hidrófobas) se fuerzan para agruparse en agregados, lo cual minimiza su exposición a las moléculas de agua circundantes.

las moléculas no polares o **hidrófobas** ("que huyen del agua") se congregan a fuerza, con lo cual minimizan su exposición al medio polar (fig. 2-5). Esta asociación de moléculas no polares se conoce como **interacción hidrófoba**. Esto explica por qué las gotas de grasa reaparecen con rapidez en la superficie de una sopa de res o pollo aun después de mezclar el líquido con una cuchara. También esta es la razón de que los grupos no polares tiendan a localizarse en el interior de la mayoría de las proteínas solubles, lejos de las moléculas de agua que las rodean.

Las interacciones hidrófobas descritas no se clasifican como enlaces verdaderos debido a que éstas no son el resultado de una

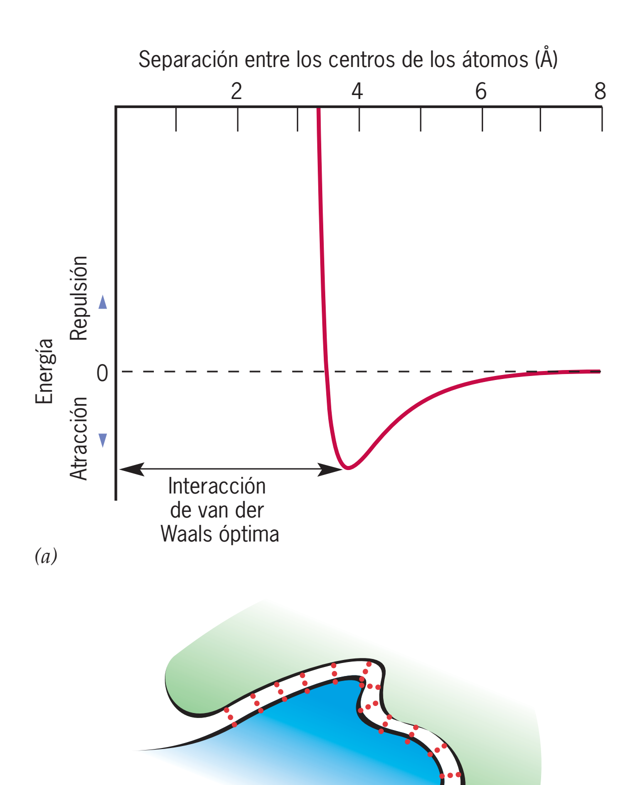


FIGURA 2-6 Fuerzas de van der Waals. *a*) A medida que dos átomos se aproximan el uno al otro, experimentan una débil fuerza de atracción que se incrementa por arriba de una distancia específica, por lo general unos 4 Å. Si los átomos se aproximan más, sus nubes electrónicas se repelen de modo recíproco y dan lugar a que los átomos se separen. *b*) Aunque las fuerzas de van der Waals individuales son muy débiles, un gran número de estas fuerzas de atracción se puede formar si dos macromoléculas tienen una superficie complementaria, como se indica de forma esquemática en esta figura (véase la fig. 2-40 para un ejemplo).

atracción entre las moléculas hidrófobas.[2] Además de este tipo de interacción, los grupos hidrófobos pueden formar uniones débiles entre sí basadas en las atracciones electrostáticas. Las moléculas polares se vinculan debido a que tienen una distribución asimétrica permanente de carga en su estructura. Un análisis detallado de los enlaces covalentes que conforman una molécula no polar (como H_2 o CH_4) revela que la distribución de los electrones no siempre es simétrica. La distribución de electrones alrededor de un átomo en un instante definido es un tema estadístico y por tanto varía de un momento a otro. En consecuencia, en un momento particular, la densidad de electrones puede ser mayor en un lado del átomo, aunque el átomo comparta por igual los electrones con algún otro átomo. Estas asimetrías transitorias en la distribución de electrones crean separaciones momentáneas de carga (*dipolos*) dentro de la molécula. Si dos moléculas con dipolos transitorios se hallan muy cercanas y orientadas de manera apropiada, experimentan una atracción débil conocida como **fuerzas de van der Waals** que une a estas moléculas. Más aún, la separación momentánea de carga en una molécula puede *inducir* una separación similar en una molécula adyacente. De esta forma, se pueden generar fuerzas de atracción adicionales entre moléculas no polares. Una sola fuerza de van der Waals es muy débil (0.1 a 0.3 kcal/mol) y muy sensible a la distancia que separa a los dos átomos (fig. 2-6*a*). Sin embargo, como se analiza en capítulos posteriores, las moléculas biológicas que interaccionan entre sí, por ejemplo, un anticuerpo y una proteína en la superficie de un virus, por lo general poseen estructuras complementarias. Como resultado, muchos átomos de las moléculas que interactúan tienen la oportunidad de aproximarse de manera muy cercana (fig. 2-6*b*) y por tanto las fuerzas de van der Waals son un factor importante en las interacciones biológicas.

Las propiedades del agua mantienen la vida

La vida en la Tierra depende por completo del agua y este líquido puede ser esencial para la existencia en cualquier parte del universo. Aunque sólo contiene tres átomos, una molécula de agua posee una estructura única que confiere a esta molécula propiedades extraordinarias.[3] Entre las más importantes figuran las siguientes:

1. El agua es una molécula muy asimétrica con el átomo de O en un extremo y con los dos átomos de H en el extremo opuesto.
2. Cada uno de los dos enlaces covalentes en la molécula está muy polarizado.
3. Los tres átomos en una molécula de agua pueden formar puentes de hidrógeno.

Los atributos de la molécula del agua para mantener la vida proceden de estas características.

Cada molécula de agua puede formar enlaces de hidrógeno hasta con otras cuatro moléculas de agua y crear una red de moléculas interconectadas (fig. 2-7). Cada enlace de hidrógeno se forma cuando este elemento con carga parcial positiva de una molécula de agua se alinea con un átomo del oxígeno parcialmente negativo de otra molécula de agua. Debido al gran número de enlaces de hidrógeno, las moléculas de agua tienden de manera repentina a adherirse entre sí. Esta característica es más evidente al considerar las propiedades térmicas del agua. Por ejemplo, cuando se calienta agua, la mayor parte de la ener-

[2] Este enunciado refleja una hipótesis aceptada según la cual un incremento de la entropía (desorden) determina las interacciones hidrófobas. Cuando un grupo hidrófobo se proyecta dentro de un solvente acuoso, las moléculas del agua se ordenan en una jaula alrededor de los grupos hidrófobos. Las moléculas solventes se desordenan cuando el grupo hidrófobo se aleja del solvente circundante. Puede encontrarse una exposición de este y otros puntos de vista en *Nature* 437:640, 2005 y en *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16:152, 2006.

[3] Una manera de valorar la estructura del agua consiste en compararla con H_2S. Al igual que el oxígeno, el azufre tiene seis electrones en su capa externa y forma enlaces simples con dos átomos de hidrógeno. Empero, el átomo de azufre es más grande y por lo tanto menos electronegativo que el oxígeno y su capacidad para formar enlaces de hidrógeno es muy reducida. A temperatura ambiente, el H_2S es un gas, no un líquido. En realidad, la temperatura debe descender a −86°C antes que el H_2S se congele para formar un sólido.

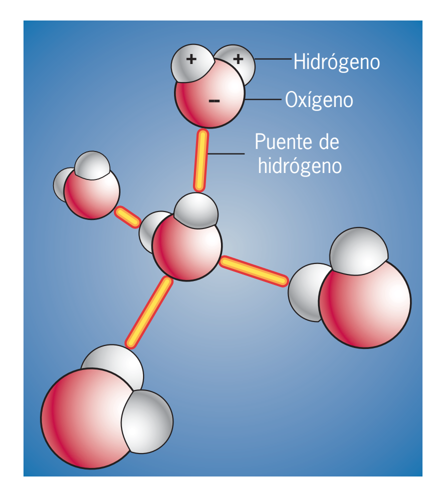


FIGURA 2-7 Formación de los puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua contiguas. Cada átomo de H de una molécula tiene alrededor de cuatro décimas de una carga positiva completa y el átomo simple de O cerca de ocho décimas de una carga negativa completa.

gía térmica se consume para romper los puentes de hidrógeno en lugar de contribuir al movimiento de las moléculas (que se mide como aumento de la temperatura). De manera similar, la evaporación desde el estado líquido al gaseoso exige romper los puentes de hidrógeno que mantienen unidas a las moléculas de agua con sus vecinas y por esa razón se necesita tanta energía para convertir agua en vapor. Los mamíferos sacan provecho de esta propiedad cuando sudan, puesto que el calor requerido para la evaporación del sudor se absorbe del cuerpo y posibilita que se enfríe el organismo.

El pequeño volumen de agua en estado líquido presente en una célula contiene una mezcla muy compleja de sustancias disueltas, o *solutos.* De hecho, el agua es capaz de disolver más tipos de sustancias que cualquier otro solvente. Sin embargo, el agua es más que un solvente; determina la estructura de las moléculas biológicas y los tipos de interacciones en las que participa. El agua es el líquido matriz en el cual se construye la estructura insoluble de la célula. También es el medio a través del cual los materiales se mueven de un compartimiento a otro de la célula; es un reactivo o producto en muchas reacciones químicas, y protege de muchas formas a las células, por ejemplo, del calor excesivo, frío y radiación perjudicial.

El agua es un factor de gran importancia en la célula debido a su capacidad para formar interacciones débiles con diferentes tipos de grupos químicos. Recuerde que en la página 35 se describió cómo las moléculas de agua, con sus enlaces con alta polarización O—H forman una cubierta que rodea a los iones y los aísla entre sí. De manera similar, las moléculas de agua crean puentes de hidrógeno con las moléculas orgánicas que tienen grupos polares, como los aminoácidos y azúcares (fig. 2-8), y también con las macromoléculas de la célula. Las moléculas polares son solubles dentro de las células debido a que son capaces de formar enlaces débiles no covalentes con el agua.

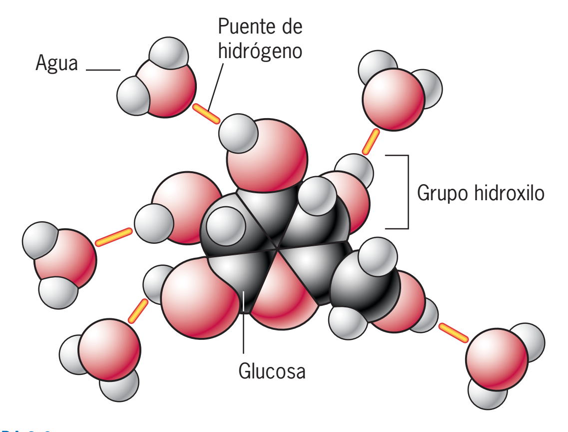


FIGURA 2-8 Vista esquemática de los tipos de puentes de hidrógeno que pueden formarse entre una molécula de azúcar y el agua en la cual está disuelta. La molécula de azúcar se muestra con base en un modelo de volumen completo, que es una manera común de representar la estructura de una molécula.

REVISIÓN ?

1. Describa algunas de las propiedades que distinguen a los enlaces covalentes de los no covalentes.
2. ¿Qué determina que las moléculas polares, como el azúcar, se disuelvan en agua?, ¿por qué las gotas de grasa se forman en las superficies de soluciones acuosas?, ¿cómo ayuda la sudoración para enfriar la superficie corporal?

2.3 ÁCIDOS, BASES Y AMORTIGUADORES

Los protones no sólo se encuentran dentro del núcleo atómico, sino que también se liberan dentro del medio, siempre que un átomo de hidrógeno pierda un electrón. Considérese el ácido acético (ingrediente esencial del vinagre), que puede sufrir la siguiente reacción descrita como *disociación.*

$$\begin{array}{c}\text{H}\ \ \ddot{\text{O}}\!: \\ \text{H}\!:\!\ddot{\text{C}}\!:\!\text{C} \\ \text{H}\ \ :\!\ddot{\text{O}}\!: \\ \text{H}\end{array} \longrightarrow \begin{array}{c}\text{H}\ \ \ddot{\text{O}}\!: \\ \text{H}\!:\!\ddot{\text{C}}\!:\!\text{C} \\ \text{H}\ \ :\!\ddot{\text{O}}\!:^- \end{array} + \text{H}^+$$

Ácido acético — Ion acetato — Protón (ion hidrógeno)

Una molécula capaz de liberar (donar) un ion hidrógeno se llama **ácido**. El protón liberado por la molécula del ácido acético en la reacción previa no permanece en estado libre; se combina con otra molécula. Las posibles reacciones en las cuales participa un protón incluyen las siguientes:

- Combinación con una molécula de agua para formar un ion hidronio (H_3O^+).

$$H^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+$$

- Combinación con un ion hidroxilo (OH^-) para formar una molécula de agua.

$$H^+ + OH^- \rightarrow H_2O$$

- Combinación con un grupo amino ($—NH_2$) en una proteína para formar una amina con carga.

$$H^+ + —NH_2 \rightarrow —NH_3^+$$

Cualquier molécula capaz de aceptar un protón se define como una **base**. Los ácidos y bases existen en pares, o *parejas*. Cuando el ácido pierde un protón (como cuando el ácido acético dona un ion hidrógeno), se forma una base (en este caso, ion acetato) y se conoce como *base conjugada* del ácido. De manera similar, cuando una base (como un grupo $—NH_2$) acepta un protón, forma un ácido (en este caso $—NH_3^+$), el cual se denomina *ácido conjugado* de dicha base. Así, el ácido siempre contiene una carga positiva más que su base conjugada. El agua es un ejemplo de una molécula *anfótera*, esto es, aquella que puede servir como ácido o base:

$$\underset{\text{Ácido}}{H_3O^+} \rightleftharpoons H^+ + \underset{\text{Molécula anfótera}}{H_2O} \rightleftharpoons \underset{\text{Base}}{OH^-} + H^+$$

Se discute otro importante grupo de moléculas anfóteras, los aminoácidos, en la página 50.

Los ácidos varían de manera considerable en cuanto a la facilidad con la cual la molécula llega a donar un protón. Cuanto más fácil se pierda el protón, es decir, cuanto menor sea la fuerza de atracción de la base conjugada por su protón, más fuerte es el ácido. El cloruro de hidrógeno (o ácido clorhídrico) es un ácido muy fuerte que transfiere con rapidez su protón a las moléculas de agua cuando se disuelve. La base conjugada de un ácido fuerte, como el HCl, es una base débil (cuadro 2-1). El ácido acético, en cambio, es un ácido relativamente débil porque en su mayor parte permanece sin disociarse cuando se disuelve en agua. Se puede considerar el grado de disociación de un ácido como la competencia por protones entre los componentes de una solución. El agua es un buen competidor, es decir, una base más fuerte en comparación con el ion cloro, de modo que el HCl se disocia por completo. Por el contrario, el ion acetato es una base más fuerte que el agua y por lo tanto permanece sin disociarse.

La acidez de una solución se mide por la concentración de iones hidrógeno[4] y se expresa en términos de **pH**.

$$pH = -\log [H^+]$$

donde $[H^+]$ es la concentración molar de protones. Por ejemplo, una solución con un pH de 5 tiene una concentración de iones hidrógeno de 10^{-5} M. Debido a que la escala de pH es logarítmica, un incremento de una unidad de pH corresponde a un incremento de 10 veces la concentración de OH^- (o una disminución de 10 veces la concentración de H^+). Por ejemplo, la concentración de H^+ en el jugo gástrico (pH 1.8) es casi un millón de veces la concentración de este ion en la sangre (pH 7.4).

Cuando una molécula de agua se disocia en un ion hidroxilo y un protón, $H_2O \rightarrow H^+ + OH^-$, la constante de equilibrio para la reacción se puede representar como:

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$$

Puesto que la concentración de agua pura siempre es de 55.51 M, es posible generar una nueva constante, K_W, o *constante de producto iónico* para el agua:

$$K_W = [H^+][OH^-]$$

[4] En soluciones acuosas, los protones no existen en el estado libre, sino como H_3O^+ o $H_5O_2^+$. Con fines de sencillez, se alude a ellos tan sólo como protones o iones hidrógeno.

Cuadro 2-2 Fuerzas de ácidos y bases

	Ácidos	Bases	
Muy débil	H_2O	OH^-	Fuerte
Débil	NH_4^+	NH_3	Débil
	H_2S	S^{2-}	
	CH_3COOH	CH_3COO^-	
	H_2CO_3	HCO_3^-	
Fuerte	H_3O^+	H_2O	Muy débil
	HCI	CI^-	
	H_2SO_4	SO_4^{2-}	

que es igual a 10^{-14} a 25°C. La concentración de ambas especies en el agua pura se aproxima a 10^{-7} M. El grado sumamente bajo de disociación del agua indica que es un ácido muy débil. En presencia de un ácido, la concentración de iones hidrógeno se eleva y la concentración de iones hidroxilo desciende (como resultado de la combinación con protones para formar agua), de modo que el producto iónico permanece en 10^{-14}.

La mayor parte de los procesos biológicos es muy sensible al pH debido a que los cambios de la concentración del ion hidrógeno afectan el estado iónico de las moléculas biológicas. Por ejemplo, conforme aumenta la concentración de ion hidrógeno, los grupos $—NH_2$ del aminoácido arginina se protonan para formar $—NH_3^+$, que puede alterar la actividad de toda proteína. Incluso cambios ligeros de pH pueden impedir reacciones biológicas. Los organismos, y las células que los forman, están protegidos de variaciones de pH por **amortiguadores**, compuestos que reaccionan con iones de hidrógeno o hidroxilos libres y por lo tanto resisten los cambios de pH. Las soluciones amortiguadoras contienen de manera normal un ácido débil junto con una base conjugada. Por ejemplo, la sangre está amortiguada por ácido carbónico e iones bicarbonato que en condiciones normales mantienen el pH sanguíneo en una cifra cercana a 7.4.

$$\underset{\text{Ion bicarbonato}}{HCO_3^-} + \underset{\text{Ion hidrógeno}}{H^+} \rightleftharpoons \underset{\text{Ácido carbónico}}{H_2CO_3}$$

Si la concentración de ion hidrógeno se eleva (como ocurre durante el ejercicio), los iones bicarbonato se combinan con el exceso de protones y se eliminan de la solución. Inversamente, el exceso de iones OH^- (que se generan durante la hiperventilación) se neutraliza por protones derivados del ácido carbónico. El pH del líquido intracelular está regulado de manera similar por un sistema amortiguador de fosfato que consiste en $H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-}.

REVISIÓN ?

1. Si se agrega ácido clorhídrico al agua, ¿qué efecto debe tener éste en la concentración del ion hidrógeno, el pH o la carga iónica de cualquier proteína en solución?
2. ¿Cuál es la relación entre una base y su ácido conjugado?

2.4 LA NATURALEZA DE LAS MOLÉCULAS BIOLÓGICAS

La mayor parte de la masa total de un organismo es agua. Si se evapora el agua, casi todo el peso seco consta de moléculas que contienen átomos de carbono. Cuando se descubrió lo anterior se pensó que las moléculas que poseen carbono sólo estaban presentes en los organismos vivos y por lo tanto se las denominó *moléculas orgánicas* para distinguirlas de las *moléculas inorgánicas* que se encuentran en el mundo inanimado. A medida que los químicos aprendieron a sintetizar más y más moléculas compuestas de carbono en el laboratorio, se perdió el misterio relacionado con los compuestos orgánicos. Los compuestos producidos por organismos vivientes se conocieron como **bioquímicos**.

La química de la vida se centró alrededor de la química del átomo de carbono. La característica esencial del carbono que le permite desempeñar este papel es el número increíble de moléculas que puede formar. El átomo de carbono posee cuatro electrones en su órbita externa y por consiguiente puede unirse a otros cuatro átomos. De manera más relevante, cada átomo de carbono es capaz de unirse con otros átomos de carbono para construir moléculas que contienen esqueletos de largas cadenas de átomos de carbono. Los esqueletos que tienen carbono pueden ser lineales, ramificados o cíclicos.

```
                                                    C
                                                    |
                         C                          C
                       /   \                        |
C—C—C—C—C—C           C     C         C—C—C—C—C—C
                      |     |             |
                      C     C          C—C—C
                       \   /              |
                         C

   Lineal              Cíclico          Ramificado
```

El colesterol, cuya estructura se ejemplifica en la figura 2-9, ilustra diferentes disposiciones de los átomos de carbono.

El tamaño y la estructura electrónica del carbono hacen que éste tenga características adecuadas para generar numerosas moléculas, de las cuales se conocen varios cientos de miles. En

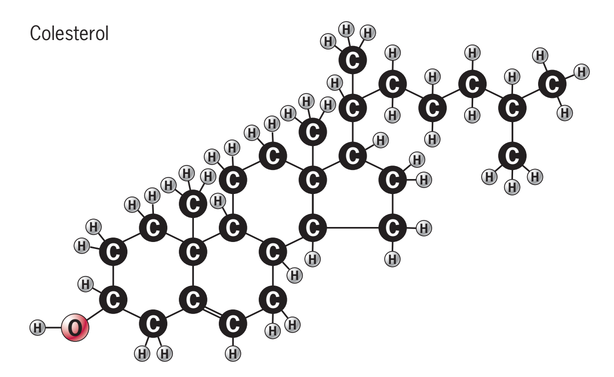


FIGURA 2-9 La estructura del colesterol ilustra la forma en que los átomos de carbono (representados por círculos negros) son capaces de crear enlaces covalentes hasta con otros cuatro átomos de carbono. Como resultado, los átomos de carbono se pueden unir para formar los esqueletos de una variedad virtualmente ilimitada de moléculas orgánicas. El esqueleto de carbono de la molécula de colesterol incluye cuatro anillos, que es característico de los esteroides (p. ej., estrógeno, testosterona, cortisol). La molécula de colesterol mostrada aquí se trazó con un modelo de esferas y barras, otra manera de mostrar la estructura molecular.

cambio, el silicio, que se halla justo por debajo del carbono en la tabla periódica, y que también posee cuatro electrones en su órbita externa (véase fig. 2-1), es asimismo demasiado grande para que la carga positiva de su núcleo atraiga electrones de la órbita externa de los átomos vecinos con fuerza suficiente para mantener un nivel estructural de moléculas grandes. Se puede entender la naturaleza de las moléculas biológicas si se inicia el estudio con el grupo más simple de las moléculas orgánicas, los *hidrocarburos*, que sólo contienen átomos de carbono e hidrógeno. La molécula de etano (C_2H_6) es un hidrocarburo simple:

```
    H  H
    |  |
 H—C—C—H
    |  |
    H  H

   Etano
```

Consta de dos átomos de carbono en los cuales cada carbono está unido a otro carbono y tres átomos de hidrógeno. Cuantos más carbonos se agreguen, el esqueleto de las moléculas orgánicas incrementa el tamaño y su estructura adquiere mayor complejidad.

Grupos funcionales

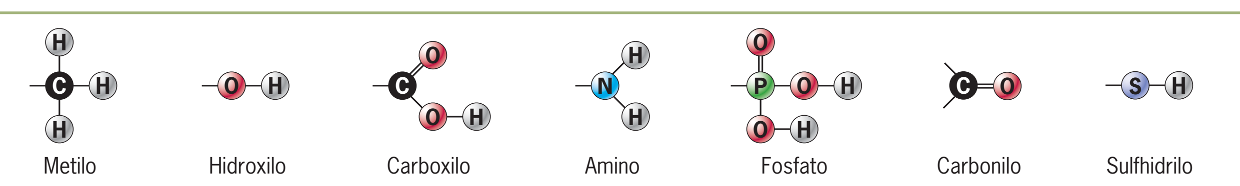
Los hidrocarburos no se encuentran en cantidades significativas dentro de la mayoría de las células vivas (se piensa que constituyen la totalidad de los combustibles fósiles formados a partir de las plantas y animales antiguos). Muchas moléculas orgánicas que son importantes en la biología contienen cadenas de átomos de carbono semejantes a los hidrocarburos, pero ciertos átomos de hidrógeno se sustituyen por varios **grupos funcionales**. Estos últimos son en particular agrupaciones de átomos que se conforman casi siempre como una unidad y confieren a las moléculas orgánicas sus propiedades físicas, reactividad química y solubilidad en solución acuosa. Algunos de los grupos funcionales más comunes se listan en el cuadro 2-2. Dos de los más importantes enlaces entre los grupos funcionales son los **enlaces tipo éster**, que se forman entre ácidos carboxílicos y alcoholes, y los **enlaces de amida**, los cuales se forman entre los ácidos carboxílicos y las aminas.

```
  O                      O
  ‖             |        ‖     |
—C—OH + HO—C—  →  —C—O—C—
                |              |
 Ácido     Alcohol        Éster

  O                       O
  ‖             |         ‖     |
—C—OH + HN—C—  →  —C—N—C—
                |               |
 Ácido      Amina         Amida
```

La mayor parte de los grupos en el cuadro 2-2 posee uno o más átomos electronegativos (N, P, O, o éstos y S) y hacen a las moléculas orgánicas más polares, solubles en agua y reactivas. Diferentes grupos funcionales pueden ionizarse y adquirir carga positiva o negativa. Se puede demostrar el efecto de sustituir varios grupos funcionales. El hidrocarburo etano (CH_3CH_3) es un gas inflamable tóxico. Si se sustituye uno de los hidrógenos con un grupo hidroxilo (—OH) la molécula resultante (CH_3CH_2OH) se convierte en algo agradable al paladar, es

Cuadro 2-2 Grupos funcionales



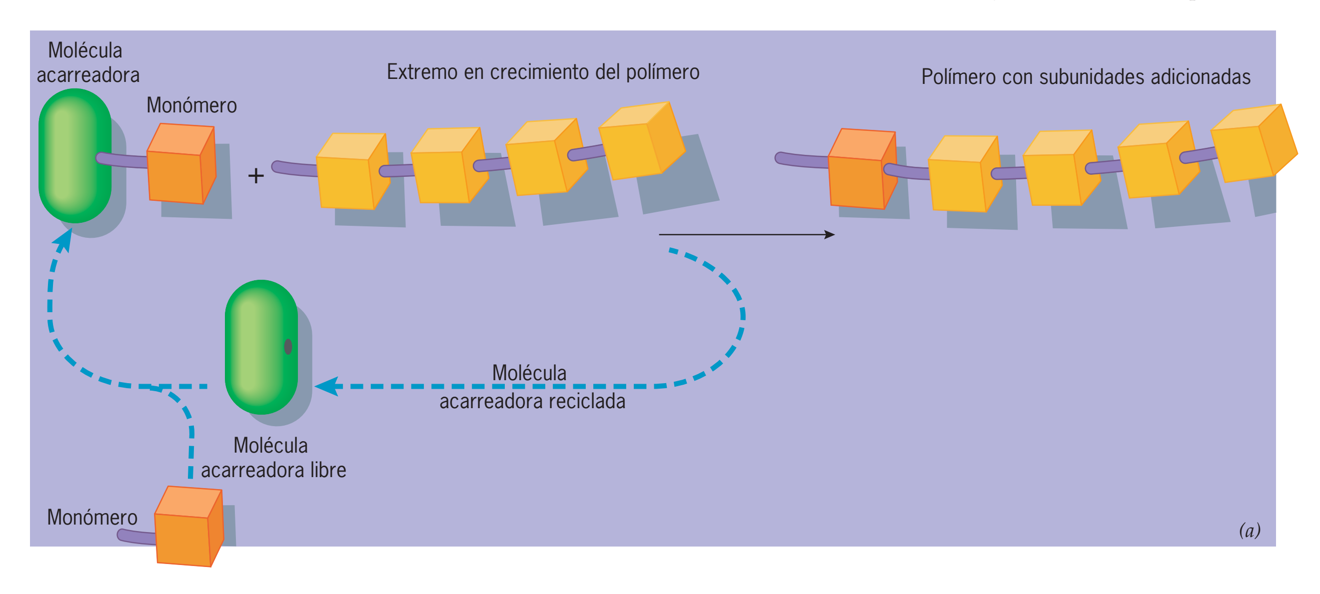
decir, alcohol etílico (o etanol). Si se reemplaza con un grupo carboxilo (—COOH), la molécula se convierte en un ácido acético (CH_3COOH), mejor conocido como vinagre. Si se sustituye por un grupo sulfhidrilo (—SH), se obtiene CH_3CH_2SH, un compuesto de olor fétido intenso, el etilmercaptano, usado por los bioquímicos en el estudio de las reacciones enzimáticas.

Clasificación de las moléculas biológicas de acuerdo con su función

Las moléculas orgánicas encontradas a menudo dentro de las células vivas se pueden dividir en varias categorías, según sea su función en el metabolismo.

1. ***Macromoléculas.*** Las moléculas que forman la estructura y ejecutan las actividades de las células son moléculas grandes, muy organizadas, llamadas **macromoléculas**, que en todos los casos contienen desde docenas hasta millones de átomos de carbono. Debido a su tamaño y las intrincadas formas que éstas pueden adoptar, algunas de estas moléculas gigantes pueden realizar tareas complejas con gran precisión y eficiencia. La presencia de macromoléculas, más que cualquier otra característica, confiere a los organismos las propiedades de la vida y los separa en sentido químico del mundo inanimado.

   Las macromoléculas se pueden dividir en cuatro categorías principales: proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y ciertos lípidos. Los primeros tres tipos son *polímeros*, compuestos por un gran número de elementos de bajo peso molecular o *monómeros.* Estas macromoléculas se construyen a partir de monómeros mediante un proceso de *polimerización* que semeja la sucesión de vagones de un ferrocarril (fig. 2-10). La estructura básica y función de cada tipo de macro-



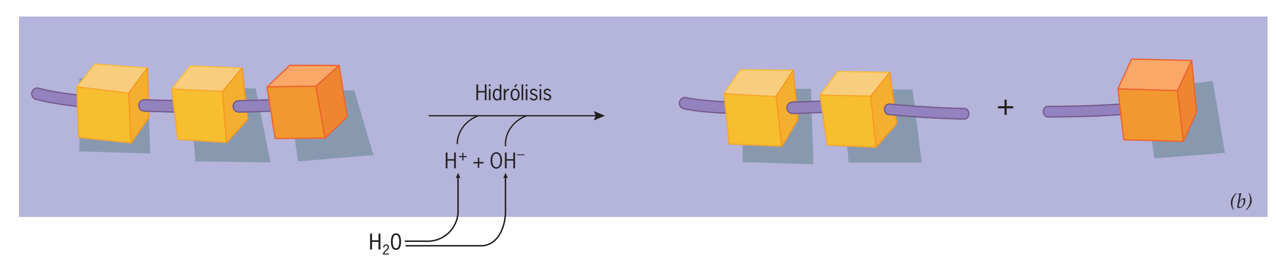


FIGURA 2-10 Monómeros y polímeros; polimerización e hidrólisis. *a*) Los polisacáridos, las proteínas y los ácidos nucleicos constan de monómeros (subunidades) unidos mediante enlaces covalentes. Los monómeros libres no reaccionan simplemente cada uno con el otro para convertirse en macromoléculas. En lugar de ello, cada monómero se activa primero por la unión de una molécula acarreadora que luego transfiere el monómero al extremo de la macromolécula en crecimiento. *b*) Una macromolécula se puede descomponer en sus monómeros mediante la hidrólisis de los enlaces que los mantienen juntos. La hidrólisis es la rotura de un enlace por el agua. Enzimas específicas catalizan todas estas reacciones.

molécula son similares en todos los organismos. Al observar con atención las secuencias específicas de los monómeros que constituyen las diferentes macromoléculas se advierte la diversidad que poseen los organismos.

2. ***Elementos unitarios para construir macromoléculas.*** La mayoría de las macromoléculas dentro de las células tiene una vida corta en comparación con la vida de la célula; con excepción del DNA, el resto de las moléculas se degrada y sustituye de forma continua por nuevas macromoléculas. Por lo anterior, casi todas las células poseen un *pool* o almacén de precursores de bajo peso molecular que de manera efectiva se incorpora a las macromoléculas. Éstas incluyen azúcares, que son los precursores de los polisacáridos; aminoácidos, precursores de las proteínas; nucleótidos, precursores de los ácidos nucleicos, y los ácidos grasos, que se incorporan dentro de los lípidos.
3. ***Intermediarios metabólicos (metabolitos).*** Las moléculas en una célula tienen estructuras químicas complejas y deben sintetizarse en una secuencia paso a paso que comienza con materiales específicos de inicio. En la célula, cada serie de reacciones químicas se conoce como una **vía metabólica**. La célula convierte un compuesto A en un compuesto B, luego en uno C, y así de modo secuencial, hasta obtener algunos de los productos finales (tal y como un aminoácido constituye un bloque de una proteína) que la propia célula puede utilizar. Los compuestos formados a lo largo de las vías metabólicas pueden generar productos que no tienen por sí mismos una función y a los cuales se les denomina **intermediarios metabólicos**.
4. ***Moléculas de función diversa.*** Desde luego, esta es una categoría muy amplia de moléculas, pero no tan grande como podría esperarse; gran parte de la masa del peso seco de una célula está formada por moléculas y sus precursores directos. Las moléculas de función diversa incluyen sustancias como vitaminas, cuya función primaria es la de coadyuvar a las proteínas; ciertas hormonas esteroides o aminoácidos; moléculas que participan en el almacenamiento de energía, como ATP (trifosfato de adenosina); moléculas reguladoras como el AMP cíclico (monofosfato de adenosina), y productos de desperdicio metabólico como puede ser la urea.

REVISIÓN

1. ¿Qué propiedades del átomo de carbono son importantes para la vida?
2. Dibuje las estructuras de cuatro grupos funcionales diferentes. ¿Cómo podría cada uno de estos grupos alterar la solubilidad de una molécula de agua?

2.5 CUATRO TIPOS DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS

Las macromoléculas descritas con anterioridad pueden dividirse en cuatro tipos de moléculas orgánicas: carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La localización de estas moléculas en estructuras celulares se puede revisar en la figura 2-11.

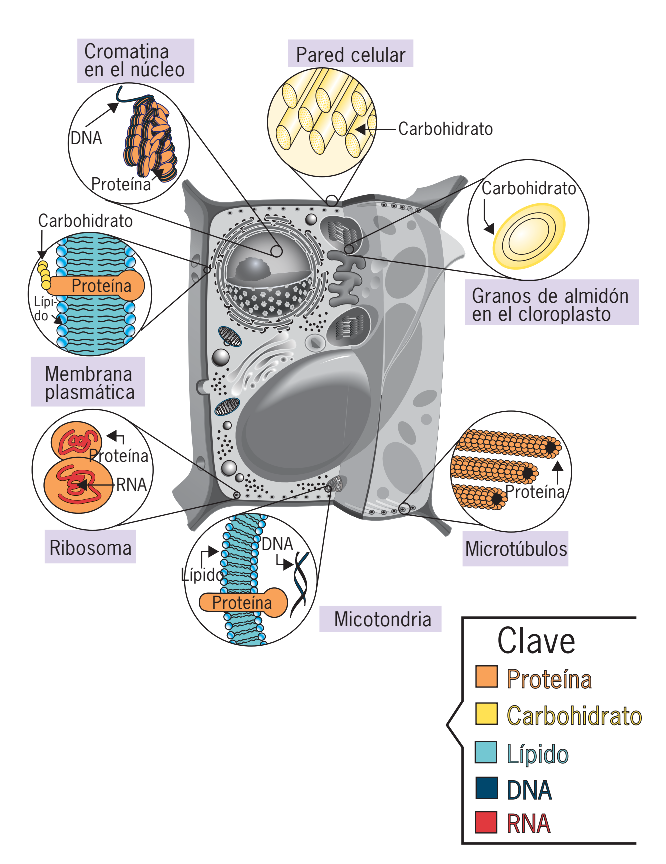


FIGURA 2-11 Una vista de los tipos de moléculas biológicas que constituyen varias estructuras celulares.

Carbohidratos

Los **carbohidratos** incluyen azúcares simples (o *monosacáridos*) y todas las moléculas grandes construidas de unidades de azúcar. Los carbohidratos funcionan de manera primaria como almacenes de energía química y materiales de construcción durables para las estructuras biológicas. La mayoría de los azúcares tiene la fórmula general $(CH_2O)_n$. Los azúcares de importancia en el metabolismo celular poseen valores de n en los límites de tres a siete. Los azúcares que contienen tres carbonos se conocen como *triosas*, aquellos con cuatro carbonos como *tetrosas*, los que tienen cinco carbonos como *pentosas*, aquellos que tienen seis carbonos son *hexosas* y los que poseen siete carbonos se conocen como *heptosas*.

Estructura de los azúcares simples Cada molécula de azúcar se integra con una estructura de átomos de carbono unidos en una disposición lineal por enlaces únicos. Cada uno de los átomos de carbono del esqueleto se conecta a un solo grupo hidroxilo, con excepción de uno que presenta un grupo *carbonilo* (C═O). Si el grupo carbonilo se localiza en una posición interna (para formar un grupo cetona), el azúcar es una *cetosa*, como la fructosa, la cual se muestra en la figura 2-12*a*. Si el carbonilo se halla en un extremo del azúcar, éste forma un grupo aldehído y la molécula se llama *aldosa*, como lo ejemplifica la glucosa, que se muestra en la figura 2-12*b-f*. No obstante, aunque las fórmulas de cadena recta mostradas en la figura 2-12*a* y *b* son útiles para comparar las estructuras de varios azúcares, no reflejan el

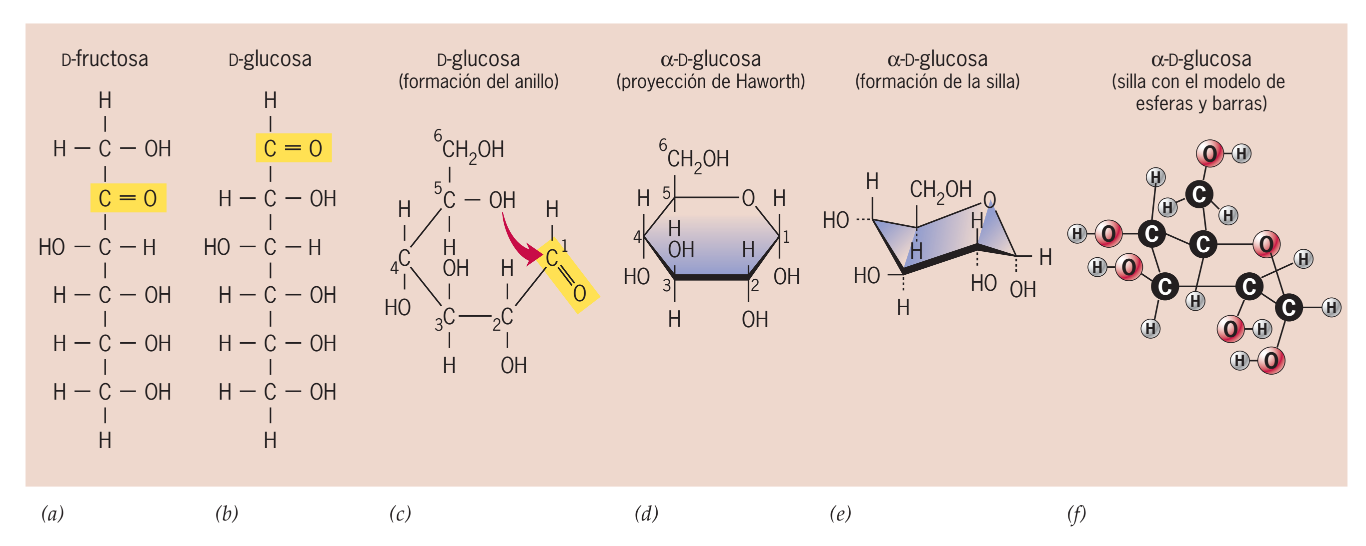


FIGURA 2-12 **Las estructuras de los azúcares.** *a*) Fórmula de cadena recta de la fructosa, una cetohexosa (Ceto indica que el carbonilo [amarillo] se localiza dentro y hexosa que contiene seis carbonos). *b*) Fórmula de cadena recta de la glucosa, una aldohexosa (aldo se refiere que el carbonilo se halla en un extremo de la molécula). *c*) Reacción espontánea en la cual la glucosa se convierte de una cadena abierta a un anillo cerrado (un anillo de piranosa). *d*) La glucosa se representa casi siempre en la forma de un anillo plano (planar) perpendicular a la página con la línea gruesa situada cerca del lector y los grupos H y OH por arriba o abajo del anillo. La base para la designación de la D-glucosa alfa se discute en la sección siguiente. *e*) La conformación en silla de la glucosa representa la estructura tridimensional de manera más exacta que el anillo plano de la parte *d*. *f*) Un modelo de esferas y barras de la conformación en silla de la glucosa que muestra la posición de varios átomos de la molécula.

hecho de que los azúcares con cinco o más átomos de carbono sufren una autorreacción (fig. 2-12*c*) que convierte a éstas en moléculas con forma de anillo. El anillo que crean los azúcares se representa como estructuras planas (*planar*) (fig. 2-12*d*) que permanecen perpendiculares al plano del papel con la línea más gruesa situada más cerca del lector. Los grupos H y OH se ubican en el plano del papel que se proyecta hacia arriba o abajo del anillo de azúcar. En realidad, el anillo de azúcar no es una estructura planar, sino que casi siempre existe en una conformación tridimensional que semeja una silla (fig. 2-12*e* y *f*).

Estereoisomerismo Como se mencionó, un átomo de carbono puede unirse con otros cuatro átomos. La disposición de los grupos alrededor del átomo de carbono se ilustra en la figura 2-13*a*, con el carbono colocado en el centro de un tetraedro y los grupos unidos y proyectados en sus cuatro esquinas. En la figura 2-13*b* se muestra una molécula de gliceraldehído, la cual es sólo una aldotriosa. El segundo átomo de carbono del gliceraldehído está unido a cuatro grupos diferentes (—H, —OH, —CHO, y —CH_2OH). Si los cuatro grupos enlazados a un átomo de carbono son todos diferentes, como el gliceraldehído, entonces

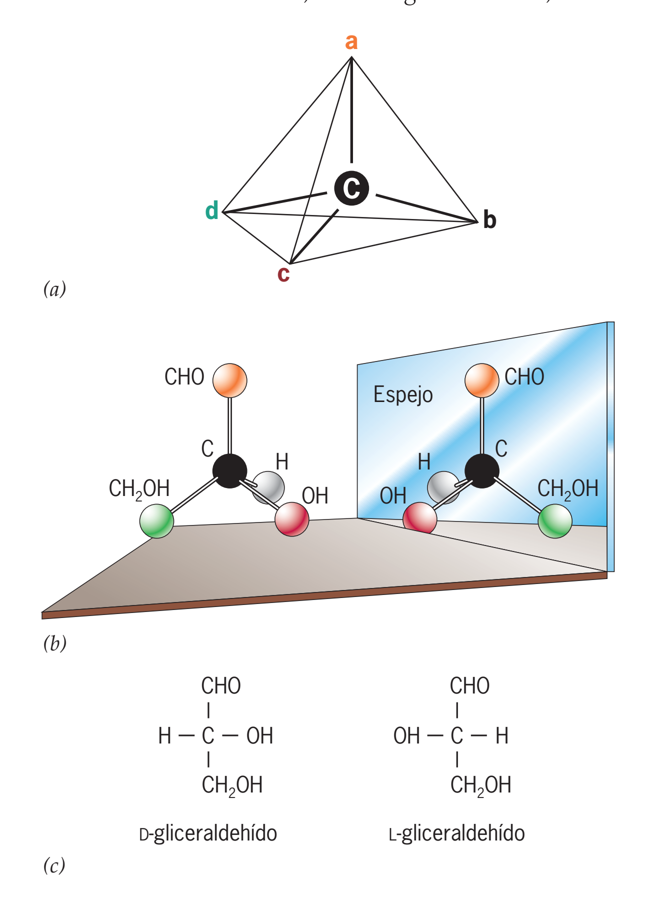


FIGURA 2-13 **Estereoisomerismo del gliceraldehído.** *a*) Los cuatro grupos unidos a un átomo de carbono (marcados a, b, c y d) ocupan las cuatro esquinas de un tetraedro con el átomo de carbono en su centro. *b*) El gliceraldehído es la única aldosa con tres carbonos; su segundo átomo de carbono está unido a cuatro grupos diferentes (—H, —OH, —CHO y —CH_2OH). Como resultado, el gliceraldehído puede existir en dos configuraciones posibles que no pueden superponerse, pero en vez de eso son imágenes especulares una de la otra como se indica. Estos dos estereoisómeros (o enantiómeros) se pueden distinguir por la configuración de los cuatro grupos que rodean al átomo de carbono asimétrico (o *quiral*). Las soluciones de estos dos isómeros hacen rotar el plano de la luz polarizada en direcciones opuestas y de este modo se dice que son activas en sentido óptico. *c*) Fórmulas de cadena recta del gliceraldehído. Por convención, el isómero D se muestra con el grupo OH a la derecha.

D-eritrosa	D-treosa	L-treosa	L-eritrosa
CHO	CHO	CHO	CHO
HCOH	HOCH	HCOH	HOCH
HCOH	HCOH	HOCH	HOCH
CH_2OH	CH_2OH	CH_2OH	CH_2OH

FIGURA 2-14 Aldotetrosas. Debido a que tienen dos átomos de carbono asimétricos, las aldotetrosas pueden existir en cuatro configuraciones.

existen dos posibilidades de configuración que no pueden superponerse. Estas dos moléculas (llamadas *estereoisómeros* o *enantiómeros*) poseen prácticamente la misma reactividad química, pero desde el punto de vista estructural son imágenes especulares (no distintas de las manos derecha e izquierda). Por convención, la molécula se llama D-gliceraldehído si el grupo hidroxilo del carbono 2 se proyecta hacia la derecha y L-gliceraldehído si se proyecta a la izquierda (fig. 2-13*c*). Debido a que actúa como sitio de estereoisomerismo, el carbono 2 se denomina átomo de carbono *asimétrico.*

A medida que el esqueleto de las moléculas de azúcar aumenta de longitud, ocurre lo mismo con el número de átomos de carbono asimétrico, y por consiguiente con el número de estereoisómeros. Las aldotetrosas tienen dos carbonos asimétricos y por lo tanto pueden existir en cuatro configuraciones diferentes (fig. 2-14). De manera similar, hay ocho aldopentosas y 16 aldohexosas distintas. La designación de cada uno de estos azúcares como D o L se basa por convención en la disposición de los grupos unidos al átomo de carbono asimétrico más alejado del aldehído (el carbono vinculado con el aldehído se designa como C1). Si el grupo hidroxilo de este carbono se proyecta hacia la derecha, la aldosa es un D-azúcar; si se proyecta a la izquierda es un L-azúcar. Las enzimas presentes en las células vivas pueden distinguir entre las formas D y L de un azúcar. En condiciones típicas, las células utilizan sólo uno de los estereoisómeros (como la D-glucosa y la L-fucosa).

En la figura 2-12*c* se muestra la autorreacción mediante la cual una molécula de glucosa de cadena recta se convierte en un anillo de seis miembros (*piranosa*). A diferencia de su precursor de cadena abierta, el C1 del anillo posee cuatro grupos diferentes y por lo tanto se convierte en nuevo centro de asimetría dentro de la molécula del azúcar. Debido a este átomo adicional de carbono asimétrico, cada tipo de piranosa existe como estereo-isómeros alfa y beta (α y β) (fig. 2-15). Por convención, la molécula es una α-piranosa cuando el grupo OH del primer carbono se proyecta por abajo del plano del anillo y una β-piranosa cuando el grupo hidroxilo se proyecta hacia arriba. La diferencia entre las dos formas tiene importantes consecuencias biológicas y los resultados, por ejemplo, son la forma compacta de las moléculas de glucógeno y almidón y la conformación extendida de la celulosa (como se discute más adelante).

Unión de azúcares entre sí Los azúcares pueden unirse uno con otro por **enlaces glucosídicos** de tipo covalente para formar grandes moléculas. Los enlaces glucosídicos se forman por una reacción entre el átomo de carbono C1 de un azúcar y el grupo hidroxilo del otro azúcar, con lo cual se crea una unión —C—O—C— entre los dos azúcares. Como se analiza más adelante (y como se indica en las figuras 2-16 y 2-17), los azúcares pueden unirse por variedades de diferentes enlaces glucosídicos. Las moléculas compuestas por sólo dos unidades de azúcares son los *disacáridos* (fig. 2-16). Los disacáridos sirven sobre todo como almacenes de energía disponible. La sacarosa, o azúcar de mesa, es el mayor componente de la savia de las plantas y lleva energía química de una parte de la planta a otra. La lactosa, presente en la leche de la mayor parte de los mamíferos, suministra a los mamíferos recién nacidos el combustible para su crecimiento y desarrollo inicial. La lactosa de la dieta se hidroliza mediante una enzima llamada lactasa, presente en la membrana plasmática de las células que recubren el intestino. Muchas personas pierden esta enzima después de la infancia y advierten que la ingestión de productos lácteos que contienen lactosa les causa malestar.

Los azúcares también pueden enlazarse juntos para formar pequeñas cadenas llamadas **oligosacáridos** (*oligo*, poco). A menudo estas cadenas se unen de manera covalente a los lípidos

CH_2OH H O OH H OH H HO H H OH β-D-glucopiranosa ⇌ $^6CH_2OH$ H ^{5}C — OH H H $_4$C H C^1 OH H O HO $_3$C—$_2$C H OH ⇌ CH_2OH H O H H OH H HO OH H OH α-D-glucopiranosa

FIGURA 2-15 Formación de piranosas alfa y beta. Cuando una molécula de glucosa experimenta una reacción espontánea para formar un anillo de piranosa (es decir, un anillo de seis miembros), se generan dos estereoisómeros. Los dos isómeros están en equilibrio entre sí a través de una forma de cadena abierta de la molécula. Por convención, la molécula es una piranosa alfa cuando el grupo OH del primer carbono se proyecta por abajo del plano del anillo y una piranosa beta si el grupo hidroxilo se proyecta por arriba.

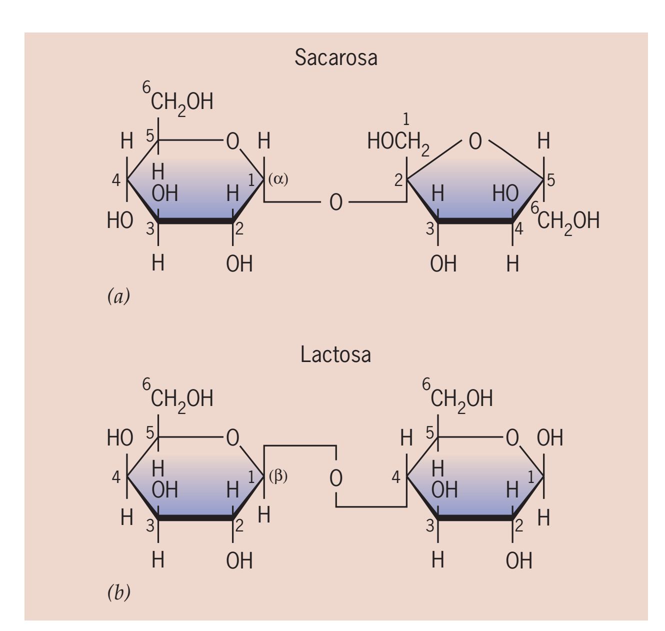


FIGURA 2-16 **Disacáridos.** La sacarosa y la lactosa son dos de los disacáridos más comunes. La sacarosa se compone de glucosa y fructosa unidas por un enlace α(1 → 2), mientras que la lactosa posee glucosa y galactosa unidas por un enlace β(1 → 4).

y las proteínas y éstas se convierten en glucolípidos y glucoproteínas, respectivamente. Los oligosacáridos son en particular importantes en los glucolípidos y las glucoproteínas de la membrana plasmática, donde ellos se proyectan desde la superficie celular (véase fig. 4-4*c*). Debido a que los oligosacáridos pueden componerse de muchas combinaciones de unidades de azúcares, estos carbohidratos pueden tener información codificada, esto es, pueden servir para distinguir un tipo de célula de otro y ayudan a mediar interacciones específicas de una célula con su ambiente.

Polisacáridos A mediados del siglo XIX se descubrió que la sangre de las personas que padecían diabetes tenía un sabor dulce debido a una elevada concentración de glucosa, la cual es el azúcar clave del metabolismo energético. Claude Bernard, notable fisiólogo francés de la época descubrió la causa de la diabetes tras investigar la fuente del azúcar sanguíneo. En aquella época se asumía que todo el azúcar presente en un ser humano o animal debía consumirse con anterioridad en la dieta. Al trabajar con perros, Bernard encontró que aun si los animales consumían una dieta del todo carente de carbohidratos, su sangre todavía contenía una cantidad normal de glucosa. Desde luego, la glucosa podía formarse en el cuerpo a partir de otro tipo de compuestos.

Después de más investigaciones, Bernard identificó que la glucosa entra a la sangre desde el hígado. Él halló que el tejido hepático contenía un polímero insoluble de glucosa y lo nombró **glucógeno**. Bernard concluyó que diferentes materiales alimenticios (como las proteínas) se llevaban al hígado donde se convertían por medios químicos en glucosa y se almacenaban en forma de glucógeno. De esta manera, cuando el cuerpo necesitaba azúcar como combustible, el glucógeno del hígado se transformaba en glucosa, la cual se liberaba a la corriente sanguínea para satisfacer las demandas de glucosa de los tejidos. En la hipótesis de Bernard, el equilibrio entre la formación y la descomposición del glucógeno en el hígado era el principal determinante para mantener la concentración relativamente constante (homeostática) de glucosa en la sangre.

La hipótesis de Bernard era correcta. La molécula a la cual llamó glucógeno es un tipo de **polisacárido**, un polímero de unidades de azúcar unidas mediante enlaces glucosídicos.

Glucógeno y almidón: polisacáridos nutricionales El glucógeno es un polímero ramificado que contiene sólo un tipo de monómero: glucosa (fig. 2-17*a*). La mayoría de las unidades de azúcar de una molécula de glucógeno está unida una con la otra por medio de enlaces del tipo α(1 → 4) glucosídicos (las uniones del tipo 2 que se muestran en la figura 2-17*a*). Los puntos de ramificación contienen un azúcar unido a tres unidades vecinas más que a dos, como en los segmentos no ramificados del polímero. El vecino adicional, que forma la ramificación, está unido por un enlace de tipo glucosídico α(1 → 6) (enlace tipo 1 en la figura 2-17*a*).

El glucógeno sirve como un almacén de energía química en la mayoría de los animales. El músculo esquelético humano, por ejemplo, casi siempre contiene suficiente glucógeno como combustible para alrededor de 30 minutos de actividad moderada. De acuerdo con varios factores, el glucógeno tiene de modo típico un peso molecular que va de uno a cuatro millones de daltones. Cuando se almacena en las células, el glucógeno está muy concentrado y aparece en las micrografías electrónicas como gránulos irregulares teñidos de oscuro (fig. 2-17*a*, a la derecha).

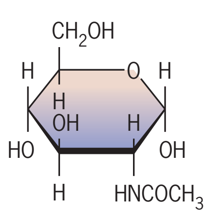
La mayor parte de las plantas almacena su excedente de energía química en forma de almidón, un polímero de la glucosa igual que el glucógeno. Las papas y los cereales, por ejemplo, contienen sobre todo almidón. En realidad, el almidón es una mezcla de dos polímeros diferentes, amilosa y amilopectina. La amilosa es una molécula helicoidal no ramificada cuyos azúcares están unidos por medio de enlaces del tipo α(1 → 4) (fig. 2-17*b*), en tanto que la amilopectina es ramificada. La amilopectina difiere del glucógeno por ser mucho menos ramificada y mostrar una ramificación irregular. El almidón se almacena en forma de granos empacados de forma densa, los *granos de almidón*, incluidos en la membrana que rodea a los organelos (*plástidos*) dentro de la célula de la planta (fig. 2-17*b*, a la derecha). Aunque los animales no sintetizan almidón, poseen una enzima (*amilasa*) que hidroliza con rapidez las moléculas de almidón.

Celulosa, quitina y glucosaminoglucanos: polisacáridos estructurales Algunos polisacáridos constituyen almacenes de energía que son digeribles con facilidad, mientras que otros forman materiales estructurales resistentes y durables. El algodón y el lino, por ejemplo, constan sobre todo de **celulosa** que constituye el principal componente de la pared de las células vegetales. Las telas de algodón deben su durabilidad a moléculas de celulosa no ramificadas y largas que se ordenan en agregados lado con lado para formar cordones moleculares (fig. 2-17*c*, lado derecho), que se elaboran de forma ideal para resistir las fuerzas de tensión. Como el glucógeno y el almidón, la celulosa consiste sólo en monómeros de glucosa; sus propiedades difieren de manera notoria de estos otros polisacáridos debido a que las unidades de glucosa están unidas por enlaces β(1 → 4) (enlace 3 en la figura

FIGURA 2-17 Tres polisacáridos con monómeros de azúcar idénticos pero con propiedades sumamente diferentes. El glucógeno (*a*) almidón (*b*) y celulosa (*c*) están compuestos en su totalidad por subunidades de glucosa, pero sus propiedades químicas y físicas son muy diferentes debido a la manera distinta en la cual se unen sus monómeros (tres tipos diversos de uniones se muestran por los números encerrados en un círculo). Las moléculas de glucógeno son las más ramificadas, las moléculas de almidón adquieren una configuración helicoidal y las moléculas de celulosa son muy largas y sin ramificación. Mientras que el glucógeno y el almidón almacenan la energía, las moléculas de celulosa están empaquetadas juntas en fibras resistentes que son adecuadas para su papel estructural. Las micrografías electrónicas coloreadas muestran los gránulos de glucógeno en una célula de hígado, los granos de almidón (amiloplastos) en una semilla vegetal y las fibras de celulosa en una pared celular vegetal; cada una se indica mediante una flecha. (FOTOS EN RECUADROS: [ARRIBA] DON FAWCETT/VISUALS UNLIMITED; [CENTRO] JEREMY BURGESS/PHOTO RESEARCHERS; [ABAJO] CABISCO/VISUALS UNLIMITED.)

2-17*c*), no tanto de los enlaces α(1 → 4). No deja de ser irónico que los animales, salvo raras excepciones, carezcan de la enzima necesaria para degradar la celulosa, que es el material orgánico más abundante sobre la Tierra y rico en energía química. Los animales que “se ganan la vida” digiriendo celulosa, como las termitas y las ovejas, pueden hacerlo porque albergan bacterias y protozoarios que sintetizan la enzima necesaria, la celulasa.

No todos los polisacáridos biológicos son monómeros de glucosa. La *quitina* es un polímero no ramificado del azúcar *N*-acetilglucosamina que es similar en estructura a la glucosa pero tiene un grupo aminoacetilo en lugar de uno hidroxilo unido en el segundo carbono del anillo.



N-acetilglucosamina

La quitina es un material estructural muy común entre los invertebrados, de manera particular en la cubierta externa de insectos, arañas y crustáceos. Es dura, resistente pero flexible, y con alta capacidad para recuperarse frente a deformaciones no muy diferente de ciertos plásticos. Los insectos deben gran parte de su éxito a este polisacárido muy adaptable que los cubre (fig. 2-18).

Otro grupo de polisacáridos con estructura más compleja es el de los **glucosaminoglucanos** (o **GAG**). A diferencia de otros polisacáridos, poseen la estructura —A—B—A—B—, en la que A y B representan dos azúcares diferentes. El GAG mejor estudiado es la heparina, que secretan algunas células en los pulmones y otros tejidos como reacción a una lesión tisular. La heparina inhibe la coagulación sanguínea y por tanto previene la formación de coágulos que pueden bloquear la circulación de la sangre al corazón o los pulmones. La heparina realiza esta función al activar un inhibidor (antitrombina) de una enzima clave (trombina) necesaria para la coagulación. La heparina, que se extrae con frecuencia de los tejidos del cerdo, se ha utilizado por décadas para impedir la formación de coágulos en pacientes sometidos a una intervención quirúrgica mayor. A diferencia de la heparina, la mayoría de los GAG se hallan sobre todo en los espacios que rodean a la célula; su estructura y función se consideran con mayor detalle en la sección 7.1. Los polisacáridos más complejos se encuentran en las paredes de las células de las plantas (sección 7.6).

Lípidos

Los lípidos son un grupo diverso de moléculas biológicas no polares cuyas propiedades comunes son su capacidad para disolverse en solventes orgánicos, como el cloroformo o el benceno, y su incapacidad para disolverse en agua, una propiedad que explica muchas de sus funciones biológicas variadas. Los lípidos importantes en la función celular incluyen a las grasas, esteroides y fosfolípidos.

Grasas Las **grasas** consisten en una molécula de glicerol unida por enlaces tipo éster a tres ácidos grasos; la molécula compuesta se denomina **triacilglicerol** (fig. 2-19*a*). Primero se considera la estructura de los **ácidos grasos**. Éstos son cadenas hidrocarbonadas largas no ramificadas con un solo grupo carboxilo en un extremo (fig. 2-19*b*). Debido a que los dos extremos de la molécula de ácido graso tienen una estructura diferente también poseen diferentes propiedades. La cadena hidrocarbonada es hidrófoba; de esta forma, el grupo carboxilo (—COOH), el cual posee una carga negativa a pH fisiológico, es hidrofílico. Las moléculas que tienen las dos regiones hidrófoba e hidrofílica son **anfipáticas**; tales moléculas muestran propiedades biológicas poco comunes. Las propiedades de los ácidos grasos pueden identificarse al momento de considerar el uso de un producto común: el jabón, que se integra con ácidos grasos. En los siglos pasados, los jabones se hacían tras calentar la grasa animal junto con un fuerte álcali (como el hidróxido de sodio [NaOH] o el hidróxido de potasio [KOH]) para romper los enlaces entre los ácidos grasos y el glicerol. Hoy en día, la mayoría de los jabones se hace de manera sintética. Los jabones deben su gran capacidad para disolver grasas al hecho de que el extremo hidrófobo de cada ácido graso puede integrarse a la grasa, en tanto que el extremo hidrofílico puede interactuar con el agua que lo rodea. Como resultado, los materiales grasos se convierten en complejos (*micelios*) dispersables en el agua (fig. 2-20).

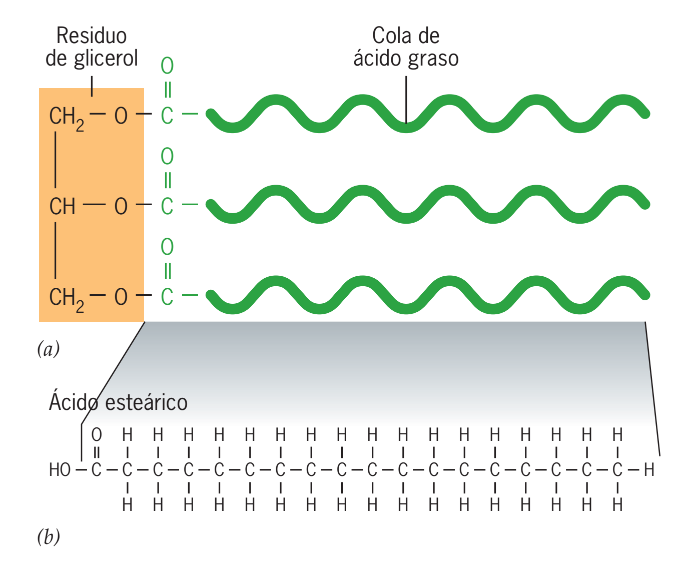
FIGURA 2-18 La quitina es el componente principal del brillante esqueleto externo de este saltamontes. (TOMADA DE ROBERT Y LINDA MITCHELL.)

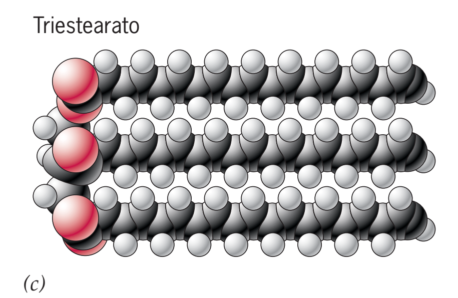
Los ácidos grasos difieren entre sí en la longitud de sus cadenas de hidrocarburos y la presencia o ausencia de enlaces dobles. Los ácidos grasos presentes en las células de manera típica varían en su longitud de 14 a 20 carbonos. Los ácidos grasos que no tienen doble enlace, como el ácido esteárico (fig. 2-19*b*), se llaman **saturados**; los que poseen dobles enlaces son **insaturados**. Los dobles enlaces (de la configuración *cis*)

H⟋ ⟍H ...

H   H   C   H
C=C   en oposición a   C=C
C   C   H   C
cis   *trans*

generan plegamientos en las cadenas de los ácidos grasos. De manera consecuente, entre más dobles enlaces tenga la cadena de ácido graso, menos probable es que estas cadenas largas puedan empaquetarse juntas. Esto baja la temperatura a la cual un lípido que contiene ácidos grasos de este tipo se puede fundir. El triestearato, cuyos ácidos grasos carecen de dobles enlaces (fig. 2-19*c*), es un componente común de las grasas animales que se conserva en estado sólido a temperaturas muy por arriba de la ambiental. Por el contrario, la abundancia de dobles enlaces





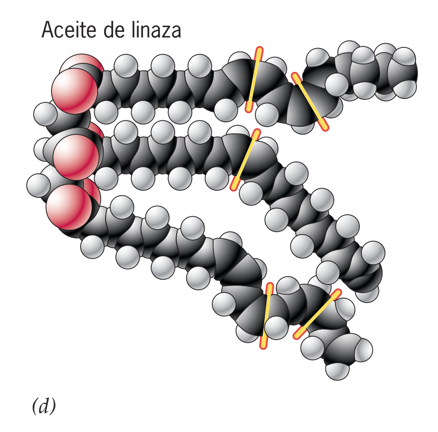


FIGURA 2-19 Grasas y ácidos grasos. *a*) Estructura básica de un triacilglicerol (también llamado triglicérido o grasa neutra). El radical glicerol, que se muestra en color naranja, está unido por tres enlaces éster a los grupos carboxilo de tres ácidos grasos cuyas colas se muestran en verde. *b*) Ácido esteárico, un ácido graso saturado de 18 carbonos que es común en grasas animales. *c*) Modelo de volumen completo de un triestearato, un triacilglicerol que contiene tres cadenas idénticas de ácido esteárico. *d*) Modelo de volumen completo del aceite de linaza, un triacilglicerol derivado de semillas de lino que posee tres ácidos grasos insaturados (ácidos linoleico, oleico y linolénico). Los sitios de instauración, que producen enrollamientos en la molécula, se indican por las barras de color amarillo y naranja.

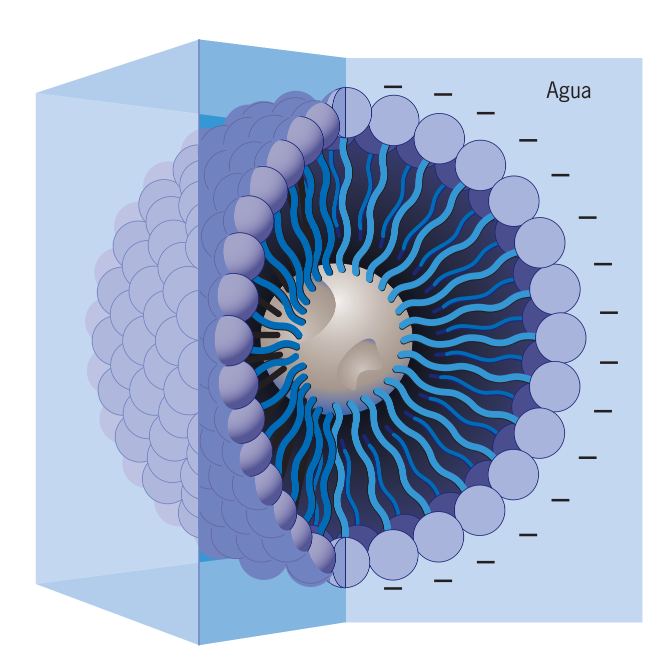


FIGURA 2-20 Los jabones se componen de ácidos grasos. En este esquema de una micela de jabón, las colas no polares de los ácidos grasos se dirigen hacia dentro, donde interactúan con la materia grasa para disolverse. Las cabezas cargadas de modo negativo se localizan en la superficie de la micela, donde interactúan con el agua circundante. Las proteínas de membrana, que también tienden a ser insolubles en agua, pueden asimismo solubilizarse de esta manera mediante la extracción de las membranas con detergentes.

en las grasas vegetales explica su estado líquido, dentro de las células vegetales y en su exterior, y por ello se las etiqueta como "poliinsaturadas". Las grasas líquidas a temperatura ambiente se denominan **aceites**. La figura 2-19*d* muestra la estructura del aceite de linaza, un lípido muy volátil extraído de las semillas de lino que se conserva en estado líquido a temperatura mucho más baja que el triestearato. Las grasas sólidas, como la margarina, están formadas por aceites vegetales insaturados mediante la reducción química de dobles enlaces por átomos de hidrógeno (proceso denominado *hidrogenación*). Una molécula de grasa puede contener tres ácidos grasos idénticos (como en la figura 2-19*c*), o puede ser una *grasa mixta* que contiene más de una especie de ácido graso (como en la figura 2-19*d*). Casi todas las grasas naturales, como el aceite de oliva o la mantequilla, son mezclas de moléculas que tienen diferentes especies de ácidos grasos.

Las grasas son muy ricas en energía química; un gramo de grasa contiene más de dos veces la energía contenida en un gramo de carbohidratos (se analiza en la sección 3.1). Los carbohidratos funcionan sobre todo como fuente de energía disponible a corto plazo, en tanto que las reservas de grasas almacenan energía a largo plazo. Se estima que una persona de estatura promedio contiene cerca de 0.5 kg de carbohidratos, en especial en forma de glucógeno. Esta cantidad de carbohidratos suministra unas 2 000 kcal de energía total. En el curso de un día de ejercicio extenuante una persona puede agotar casi toda la reserva de carbohidratos de su cuerpo. Por lo contrario, la persona promedio contiene cerca de 16 kg de grasa (equivalente a 144 000 kcal de energía) y puede tomar mucho tiempo para agotar la reserva de ese material.

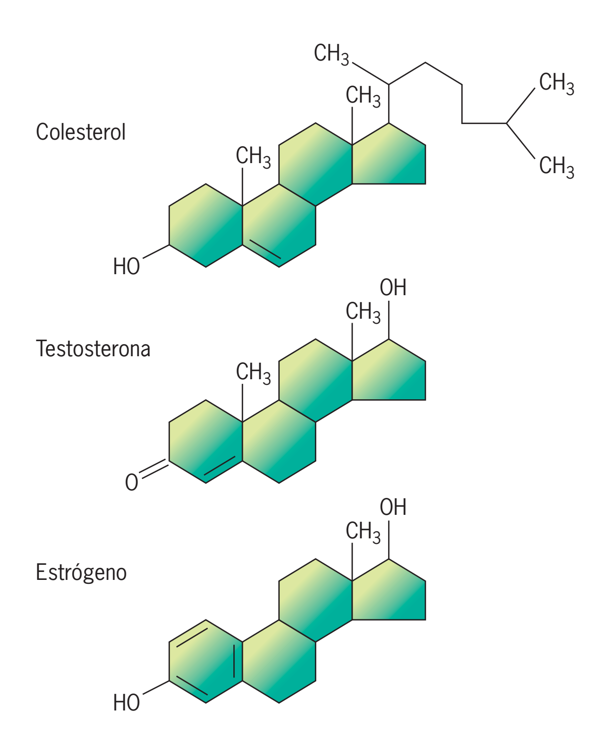


FIGURA 2-21 **Estructura de los esteroides.** Todos los esteroides comparten el esqueleto básico de cuatro anillos. Las diferencias en apariencia pequeñas de la estructura química entre el colesterol, la testosterona y el estrógeno dan lugar a divergencias biológicas notorias.

Puesto que las grasas carecen de grupos polares, son sumamente insolubles en agua y se almacenan en las células en forma de gotas de lípidos. En la medida que las gotas de lípidos no contienen agua, como los gránulos de glucógeno, representan un almacén de combustible muy concentrado. En muchos animales, las grasas se almacenan en células especiales (*adipocitos*) cuyo citoplasma se llena con una sola gota de grasa. Los adipocitos muestran una notable capacidad para cambiar de volumen y adaptar cantidades variables de grasa.

Esteroides Los esteroides se construyen alrededor de un esqueleto característico de cuatro anillos de hidrocarburo. Uno de los esteroides más importantes es el *colesterol*, componente de las membranas celulares de animales y precursor para la síntesis de numerosas hormonas esteroideas, como la testosterona, progesterona y estrógenos (fig. 2-21). El colesterol está casi ausente de las células vegetales y por esa razón los aceites vegetales se consideran “libres de colesterol”, pero las células de las plantas contienen a veces grandes cantidades de compuestos relacionados con el colesterol.

Fosfolípidos La estructura química de un fosfolípido común se muestra en la figura 2-22. La molécula parece una grasa (triacilglicerol), pero tiene sólo dos cadenas de ácidos grasos en lugar de tres, es decir, es un *diacilglicerol.* El tercer grupo hidroxilo del esqueleto de glicerol está unido de manera covalente a un grupo fosfato, el cual a su vez está unido a un pequeño grupo polar, como la colina, como se muestra en la figura 2-22. De esta forma, a diferencia de las moléculas de grasa, los fosfolípidos contienen dos extremos con propiedades muy diferentes: el extremo que contiene el grupo fosfato posee un carácter hidrofílico neto, y el otro extremo, compuesto por las dos terminaciones de ácidos grasos, muestra un carácter hidrófobo opuesto al anterior. Debido a que la función principal de los fosfolípidos es en las membranas celulares, y en virtud de que las propiedades de las membranas celulares dependen de sus componentes de fosfolípido, se describen más adelante en la sección 4.3, donde se tratan las membranas celulares.

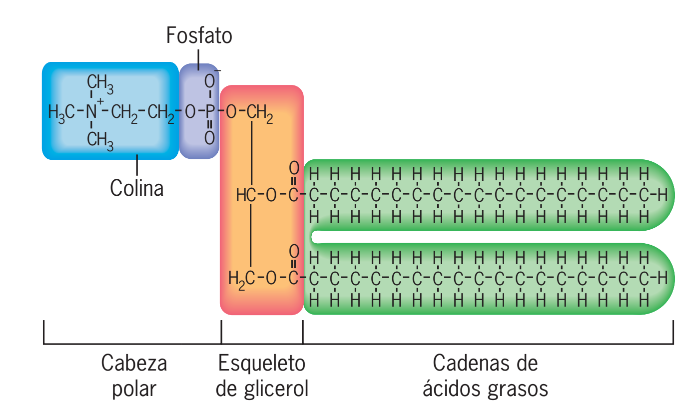


FIGURA 2-22 **El fosfolípido fosfatidilcolina.** La molécula consiste en un esqueleto de glicerol en el que sus grupos hidroxilo están unidos de forma covalente a dos ácidos grasos y un grupo fosfato. El fosfato con carga negativa está también unido a un grupo pequeño de carga positiva, la colina. El extremo de la molécula que contiene la fosforilcolina es hidrofílico, mientras que el extremo opuesto tiene una cola de ácido graso, que es hidrófoba. La estructura y función de la fosfatidilcolina y otros fosfolípidos se discuten con detalle en la sección 4.3.

Proteínas

Las proteínas son las macromoléculas que llevan a cabo virtualmente todas las actividades de la célula; son las herramientas moleculares y las máquinas que hacen que sucedan las cosas. Se estima que una célula de mamífero tiene en general tanto como 10 000 proteínas diferentes con diversas funciones. Como enzimas, las proteínas de manera notoria aceleran la velocidad de las reacciones metabólicas; como cables estructurales, las proteínas proveen apoyo mecánico tanto dentro de las células como fuera de sus perímetros (fig. 2-23*a*); como hormonas, factores de crecimiento y activadores de genes, las proteínas realizan una amplia variedad de funciones reguladoras; como receptores de membranas y transportadores, las proteínas determinan el tipo de célula a la que reaccionan y qué sustancias entran o salen de la célula; como filamentos contráctiles y motores moleculares, las proteínas constituyen la maquinaria para los movimientos biológicos. Entre sus múltiples funciones restantes, las proteínas actúan como anticuerpos, sirven como toxinas, forman los coágulos sanguíneos, absorben o refractan la luz (fig. 2-23*b*) y transportan sustancias de una parte del cuerpo a otra.

¿Cómo puede un tipo de molécula tener tantas y variadas funciones? La explicación reside en que las proteínas, *como un grupo*, pueden asumir estructuras moleculares casi ilimitadas. Sin embargo, cada proteína posee una estructura única y muy ordenada que la capacita para llevar a cabo una función en particular. Más importante todavía, las proteínas poseen formas y superficies que les permiten interaccionar de *manera selectiva* con

(a) (b)

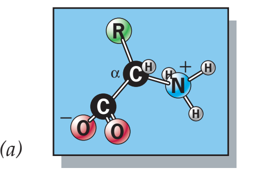
FIGURA 2-23 **Dos ejemplos de las miles de estructuras biológicas compuestas, sobre todo de proteínas.** *a*) Plumas, que son adaptaciones de las aves para suministrar aislamiento térmico, volar y reconocer el sexo. *b*) Cristalino de los ojos, como en esta araña para enfocar los rayos de luz. (*A*, Darrell Gulin/Getty Images; *B*, Mantis Wildlife Films/Oxford Scientific Films/Animals Animals.)

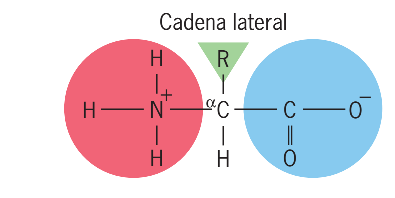
otras moléculas. Las proteínas, en otras palabras, exhiben un alto grado de **especificidad**. Es posible, por ejemplo, que una enzima sea capaz de reconocer un segmento de DNA que contiene una secuencia específica de ocho nucleótidos, al tiempo que ignora todas las otras 65 535 posibles secuencias compuestas de ese número de nucleótidos.

Unidades estructurales de las proteínas Las proteínas son polímeros formados de monómeros aminoacídicos. Cada proteína contiene una secuencia única de aminoácidos que le confiere a la molécula sus propiedades únicas. Gran parte de las propiedades de una proteína se pueden entender al examinar las propiedades químicas de los aminoácidos que las constituyen. En las proteínas se encuentran casi siempre 20 aminoácidos diferentes, sean proteínas de un virus o de un ser humano. Hay dos aspectos de la estructura de los aminoácidos que deben considerarse: los que son comunes a todos ellos y los que son únicos de cada uno. Se describen primero las propiedades compartidas.

Estructuras de los aminoácidos Todos los aminoácidos poseen un grupo amino y uno carboxilo separados entre sí por un solo

(a)





(b)

H — N — C — C — OH + H — N — C — C — OH
H_2O
H — N — C — C — N — C — C — OH
Enlace peptídico

(c)

FIGURA 2-24 **Estructura de los aminoácidos.** Modelo de esferas y barras *a*) y fórmula química general *b*) de un aminoácido en el cual el grupo R puede ser cualquier grupo químico (véase fig. 2-26). *c*) la formación de un enlace peptídico ocurre por la condensación de dos aminoácidos, dibujados aquí en estado neutro. En la célula, esta reacción ocurre en un ribosoma en el cual un aminoácido se transfiere de un acarreador (una molécula de tRNA) al extremo de la cadena polipeptídica en crecimiento (véase la figura 11-49).

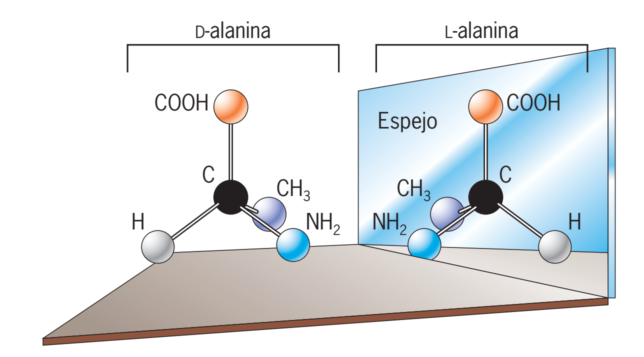
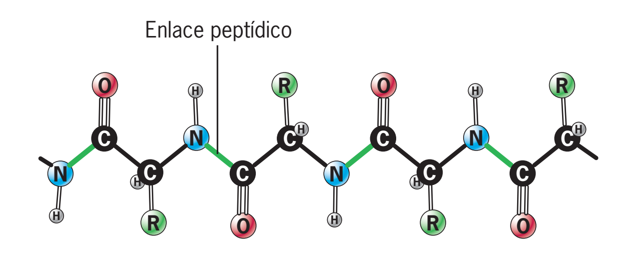


FIGURA 2-25 Estereoisomerismo de los aminoácidos. Debido a que el carbono alfa de todos los aminoácidos, con excepción de la glicina, está unido a cuatro grupos diferentes, pueden existir dos estereoisómeros. Se muestran las formas D y L de la alanina.

átomo de carbono, el carbono alfa (fig. 2-24*a* y *b*). En una solución acuosa neutral, el grupo carboxilo alfa pierde su protón y existe en un estado de carga negativa ($—COO^-$); el grupo α-amino acepta un protón y permanece en estado cargado positivo ($—NH_3^+$) (fig. 2-24*b*). En la página 43 se mencionó que los átomos de carbono se unían a cuatro diferentes grupos y pueden existir en dos configuraciones (*estereoisómeros*) a las que resulta imposible superponerse la una a la otra. Los aminoácidos también encierran átomos de carbono asimétricos. Con la excepción de la glicina, el carbono alfa de los aminoácidos se une a cuatro diferentes grupos, así que cada aminoácido puede existir en dos formas, D o L (fig. 2-25). Los aminoácidos que se emplean en la síntesis de una proteína por medio de un ribosoma son siempre los L-aminoácidos. La "selección" de L-aminoácidos debió suceder en la evolución celular temprana y esta selección se ha conservado por miles de millones de años. Empero, los microorganismos usan D-aminoácidos en la síntesis de ciertos péptidos pequeños, incluidos los que constituyen la pared celular y varios antibióticos (p. ej., gramicidina A).

Durante el proceso de la síntesis de proteína, cada aminoácido se une a otros dos aminoácidos y forma un polímero largo no ramificado y continuo llamado **cadena polipeptídica**. Los aminoácidos forman una cadena polipeptídica tras unirse con **enlaces peptídicos** que resultan de la unión de los grupos carboxilo de un aminoácido al grupo amino del aminoácido contiguo, con la eliminación de una molécula de agua (fig. 2-24*c*). Una cadena polipeptídica compuesta de un grupo de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos tiene la siguiente estructura:



En "promedio", una cadena polipeptídica contiene 450 aminoácidos. El polipéptido más largo conocido, encontrado en la proteína muscular llamada titina, posee más de 30 000 aminoácidos. Una vez incorporados a una cadena polipeptídica, los aminoácidos se conocen como *residuos*. El residuo en un extremo de la cadena, el *N-terminal*, contiene un aminoácido con un grupo α-amino libre (no enlazado); de esta forma, el residuo en el extremo opuesto, el *C-terminal*, tiene un grupo α-carboxilo libre. Además de los aminoácidos, muchas proteínas contienen otros tipos de componentes que se agregan después de la síntesis polipeptídica. Éstos incluyen carbohidratos (para formar glucoproteínas), grupos que poseen metales (para formar metaloproteínas) y grupos orgánicos (p. ej., flavoproteínas).

Las propiedades de las cadenas laterales El esqueleto, o cadena principal, del polipéptido está compuesto por la parte común de cada aminoácido. El **grupo R** o **cadena lateral** (fig. 2-24), unido al carbono alfa, es muy variable entre las 20 unidades y es esta variabilidad la que al final confiere a las proteínas su estructura diversa y actividades. Si las diferentes cadenas laterales de los aminoácidos se consideran en conjunto, muestran una gran variabilidad de características estructurales, desde los que están cargados por completo, o los hidrófobos, hasta aquellos que participan en una variedad de enlaces covalentes y no covalentes. Como se discute en el siguiente capítulo, las cadenas laterales de los "sitios activos" de las enzimas pueden facilitar (catalizar) muchas reacciones orgánicas diferentes. En las variadas características de las cadenas laterales, los aminoácidos son importantes en interacciones *intra*moleculares, que determinan la estructura y actividad de la molécula, e *inter*moleculares, las cuales establecen la relación con un polipéptido de otra molécula, incluidos otros polipéptidos (pág. 61).

Los aminoácidos se clasifican de acuerdo con la naturaleza de sus cadenas laterales. Por lo regular se agrupan en cuatro grupos: cadenas polares cargadas y cadenas polares no cargadas, cadenas no polares y aquellas con propiedades únicas (fig. 2-26).

1. ***Polar, con carga.*** Los aminoácidos de este grupo incluyen ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y arginina. Estos cuatro aminoácidos contienen cadenas laterales que pueden estar del todo encadenadas, esto es, las cadenas laterales contienen fuertes ácidos y bases orgánicas. Las reacciones de ionización del ácido glutámico y lisina se muestran en la figura 2-27. A pH fisiológico, las cadenas laterales de estos aminoácidos están casi siempre presentes en su estado cargado por completo. En consecuencia, son capaces de formar enlaces iónicos con otras especies cargadas en las células. Por ejemplo, los residuos de arginina cargados de forma positiva de las proteínas de histona se unen mediante enlaces iónicos a los grupos fosfato del DNA cargado de modo negativo (véase la figura 2-3). La histidina también se considera un aminoácido polar cargado, aunque en la mayor parte de los casos sólo presenta cadena parcial a pH fisiológico. De hecho, debido a esta capacidad para ganar o perder un protón a pH fisiológico, la histidina es un residuo en particular importante en el sitio activo de muchas proteínas (véase la figura 3-13 como ejemplo).
2. ***Polar, sin carga.*** Las cadenas laterales de estos aminoácidos tienen una carga parcial negativa o positiva y por tanto pueden formar enlaces de hidrógeno con otras moléculas, incluida la del agua. Estos aminoácidos casi siempre son muy reactivos. En esta categoría se incluyen la asparagina y

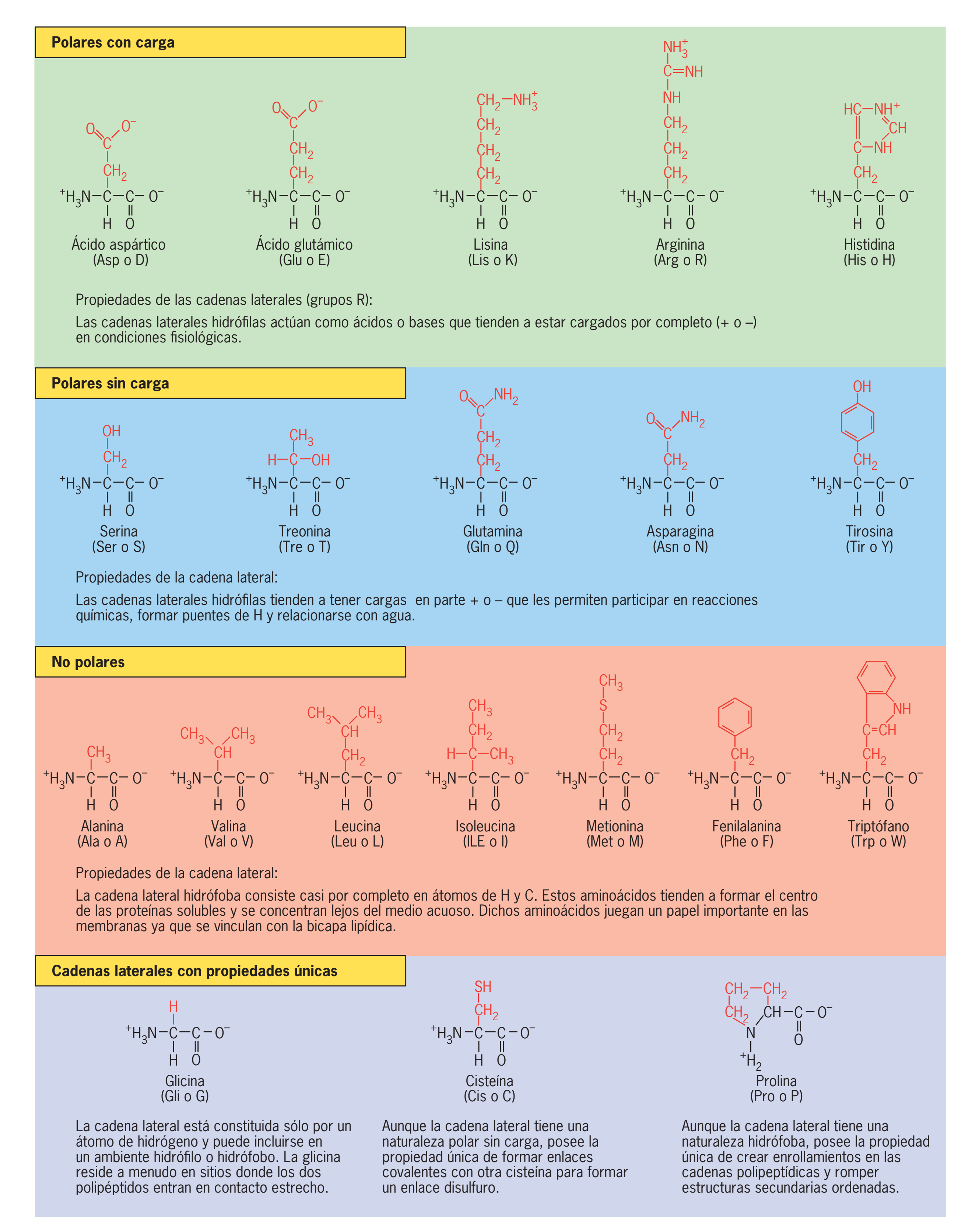


FIGURA 2-26 **Estructura química de los aminoácidos.** Estos 20 aminoácidos son los más encontrados en las proteínas y, de manera más específica, los codificados por el DNA. Además de los que se muestran aquí, puede haber otros aminoácidos como resultado de una modificación. Los aminoácidos se clasifican en cuatro grupos con base en la naturaleza de sus cadenas laterales, como se describe en el texto. Todas las moléculas están representadas como aminoácidos libres en su estado ionizado como existirían en solución a pH neutro.

FIGURA 2-27 Ionización de los aminoácidos polares cargados. *a*) La cadena lateral del ácido glutámico pierde un protón cuando su grupo carboxílico se ioniza. El grado de ionización del grupo carboxilo depende del pH del medio: cuanto más alta es la concentración del ion hidrógeno (pH bajo), menor es el porcentaje de grupos carboxilo en su estado ionizado. Inversamente, un aumento del pH da lugar a un incremento de la ionización del protón del grupo carboxilo, lo que eleva el porcentaje de las cadenas laterales de ácidos glutámicos cargados de forma negativa. El pH en el cual 50% de las cadenas laterales está ionizado y 50% no se conoce como pK, que es 4.4 para la cadena lateral del ácido glutámico libre. A pH fisiológico, prácticamente todos los residuos del ácido glutámico de un polipéptido están cargados de modo negativo. *b*) La cadena lateral de la lisina empieza a ionizarse cuando su grupo amino gana un protón. Cuanto más alta es la concentración del ion hidroxilo (pH alto), menor es el porcentaje de grupos amino con carga positiva. El pH en el cual 50% de las cadenas laterales de la lisina está cargado y 50% no es 10.0, que es el pK para la cadena lateral de la lisina libre. A pH fisiológico, casi sin excepción todos los residuos de la lisina de un polipéptido están cargados de manera positiva. Después de su incorporación a un polipéptido, el ambiente circundante puede modificar en gran medida el pK de un grupo cargado.

glutamina (amidas del ácido aspártico y el ácido glutámico), treonina, serina y tirosina.

3. ***No polar.*** Las cadenas laterales de estos aminoácidos son hidrófobas y no tienen capacidad para formar enlaces electrostáticos o interactuar con el agua. Los aminoácidos de esta categoría son alanina, valina, leucina, isoleucina, triptófano, fenilalanina y metionina. Por lo general, las cadenas laterales de los aminoácidos no polares carecen de oxígeno y nitrógeno. Varían sobre todo en forma y tamaño, lo cual permite a algunos de ellos introducirse de modo estrecho en un espacio particular dentro del núcleo de la proteína y unirse entre sí como consecuencia de las fuerzas de van der Waals y las interacciones hidrófobas.
4. ***Los otros tres aminoácidos***, glicina, prolina y cisteína tienen propiedades únicas que los distinguen de los demás. El grupo lateral de la glicina consta de un solo átomo de hidrógeno y por esta razón la glicina es un aminoácido muy importante. Debido a la falta de una cadena lateral, los residuos de glicina permiten que los esqueletos de dos polipéptidos (o dos segmentos del mismo polipéptido) se aproximen entre sí de manera muy estrecha. Además, la glicina es más flexible que los otros aminoácidos y es útil en las porciones del esqueleto que necesitan mover articulaciones. La prolina es única por poser un grupo α-amino como parte de un anillo (lo que la convierte en un iminoácido). La prolina es un aminoácido hidrófobo que no adopta con facilidad una estructura secundaria ordenada, como una α-hélice (pág. 55), y que a menudo produce acodamientos o bisagras. La cisteína contiene un grupo sulfhidrilo (—SH) reactivo que aparece con frecuencia unido a otro residuo de cisteína mediante un enlace covalente, como un **puente disulfuro** (—SS—).

Cisteína

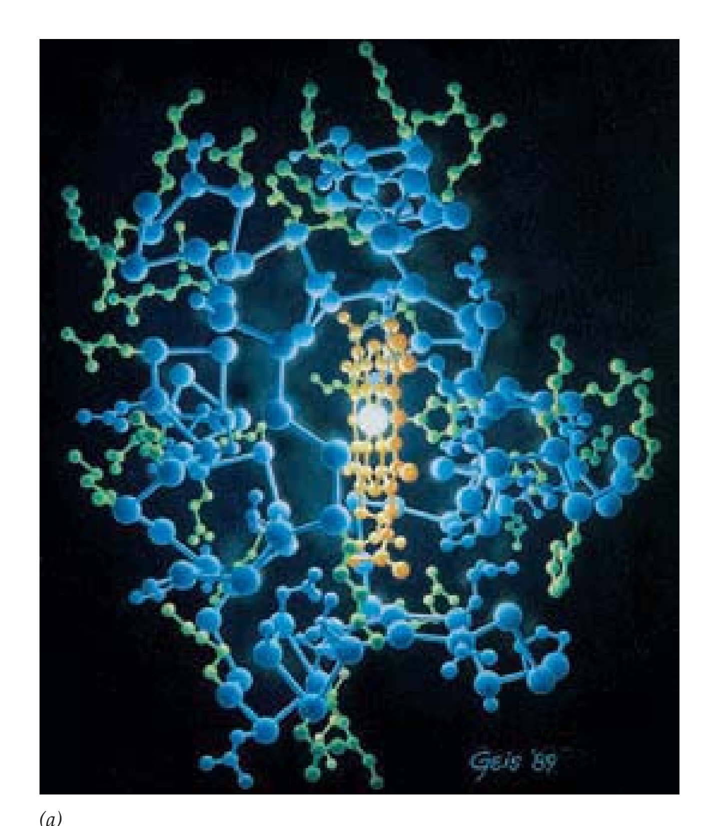
Oxidación

Reducción

$+ 2H^+ + 2e^-$

Muchas veces los puentes disulfuro se forman a partir de dos cisteínas que están distantes la una de la otra en el esqueleto polipeptídico o en dos polipéptidos separados. Los puentes disulfuro ayudan a estabilizar las formas intrincadas de las proteínas, en particular aquellas presentes fuera de las células donde están sujetas a actividad física y química.

No todos los aminoácidos descritos en esta sección se hallan en todas las proteínas ni tampoco distribuidos de una manera equivalente. Existen otros aminoácidos en las proteínas, pero son resultado de la alteración de las cadenas laterales de uno de los 20 aminoácidos básicos *después* de incorporarse a la cadena del polipéptido. Por esta razón se conocen como **modificaciones postraduccionales** (**PTM**, *posttranslational modifications*). Se han documentado docenas de tipos diferentes de PTM. La más común es la adición covalente de un grupo fosfato a un residuo serina, treonina o tirosina. Las PTM pueden generar cambios notables en las propiedades y la actividad de las proteínas, de manera más importante al modificar sus interacciones con otras moléculas (p. ej., fig. 12-55) o al acortar su lapso de vida en la célula (sección 12.7). La presencia o ausencia de un solo grupo fosfato en una proteína reguladora potencialmente puede determinar si una célula se comportará como cancerosa o normal. Debido a las modificaciones postraduccionales, un polipéptido individual puede existir como varias moléculas biológicas distintas.



(a)

(b)

FIGURA 2-28 Organización de los residuos de aminoácidos hidrófilos e hidrófobos en la proteína soluble citocromo c. *a*) Las cadenas laterales hidrófilas, que se muestran en verde, se localizan sobre todo en la superficie de la proteína donde hacen contacto con el medio acuoso circundante. *b*) Los residuos hidrófobos, que se muestran en rojo, se hallan dentro del centro de la proteína, de modo específico cerca del grupo hemo central. (Ilustración, Irving Geis. Imagen de Irving Geis Collection/Howard Hughes Medical Institute. Derechos de HHMI. Reproducida con autorización.)

El carácter iónico, polar o no polar, de las cadenas laterales de los aminoácidos es esencial en la estructura y función de las proteínas. Las proteínas más solubles (es decir, que no forman parte de la membrana) están constituidas de tal modo que los residuos polares se sitúan en la superficie de la molécula, en donde puedan unirse con las moléculas de agua circundantes y contribuir a la solubilidad de la proteína en la solución acuosa (fig. 2-28*a*). En cambio, los residuos no polares están situados sobre todo en el núcleo de la molécula (fig. 2-28*b*). Los residuos hidrófobos del interior de la proteína están a menudo muy bien empaquetados juntos y crean un tipo de rompecabezas tridimensional en el cual las moléculas de agua se excluyen casi siempre. Las interacciones hidrófobas entre las cadenas laterales no polares de estos residuos son una fuerza motriz durante el plegamiento de las proteínas (pág. 64) y contribuyen de modo sustancial a la estabilidad de la proteína. En muchas enzimas, los grupos reactivos polares se proyectan dentro del interior no polar y dan a la proteína su propiedad catalítica. Por ejemplo, un ambiente no polar puede aumentar las interacciones iónicas entre los grupos cargados, que deberían reducirse en un ambiente acuoso por competencia con el agua. Algunas reacciones que tienen lugar a una velocidad imperceptible en el agua ocurren en milésimas de segundo dentro de una proteína.

La estructura de las proteínas En ninguna otra parte de la biología se observa mejor la relación íntima entre la forma y función que en las proteínas. Éstas son moléculas enormes y complejas, pero su estructura en cualquier ambiente es por completo definida y predecible. Cada aminoácido de una proteína se localiza en un sitio específico dentro de estas moléculas gigantes y le confiere a la proteína la estructura y reactividad necesarias para la función que debe desempeñar. La estructura de la proteína se puede describir en diferentes niveles de organización; cada uno remarca un aspecto diferente y a su vez cada uno es dependiente de diferentes tipos de interacciones. Por lo general se describen cuatro niveles en la proteína: *primario*, *secundario*, *terciario* y *cuaternario.* El primero, la estructura primaria, se refiere a la secuencia de aminoácidos de una proteína, en tanto que los otros tres niveles se relacionan con la organización de la molécula en el espacio. Para entender el mecanismo de acción y la función biológica de una proteína es importante conocer cómo se constituye dicha proteína.

Estructura primaria La estructura primaria de un polipéptido es la secuencia lineal de aminoácidos específicos que constituyen la cadena. Con 20 diferentes bloques de construcción, el número de polipéptidos variados que pueden formarse es 20^n, en el que n es el número de aminoácidos en la cadena. Puesto que la mayor parte de los polipéptidos contiene mucho más de 100 aminoácidos, las posibles secuencias son prácticamente ilimitadas. La información del orden preciso de los aminoácidos en cada proteína que un organismo produce se incluye en el genoma de dicho organismo.

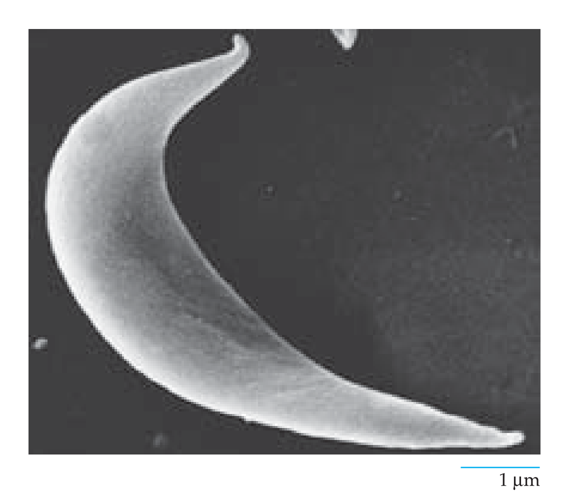


FIGURA 2-29 **Micrografía electrónica de barrido** de una célula roja sanguínea de una persona con anemia de células falciformes. Compárese con la micrografía de una célula roja sanguínea normal de la figura 4-31*a*. (Cortesía de J. T. Thornwaite, B. F. Cameron y R. C. Leif.)

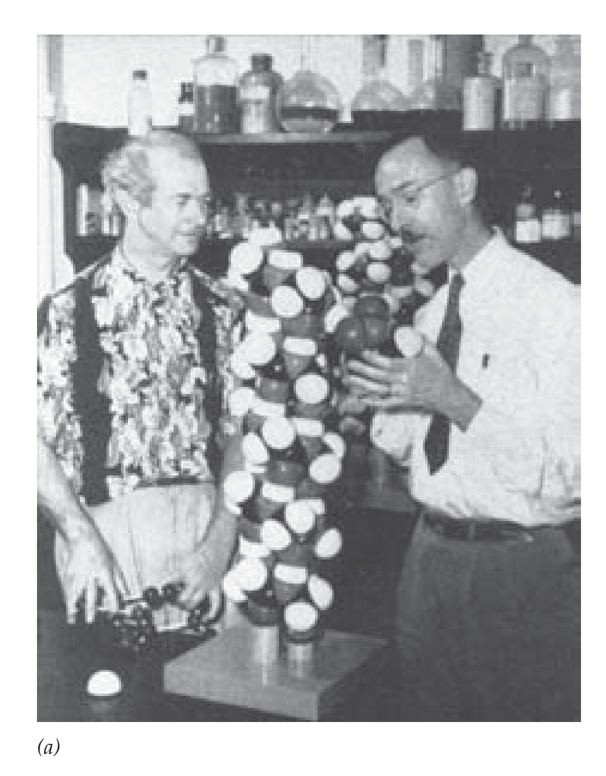
Como se verá después, la secuencia de aminoácidos suministra la información requerida para determinar la configuración tridimensional de la molécula y por lo tanto su función. Por consiguiente, la secuencia de aminoácidos es de la mayor importancia y los cambios que se originan en dicha secuencia como resultado de las mutaciones genéticas del DNA no se pueden tolerar con facilidad. El primer ejemplo y mejor estudiado de esta relación es el cambio de la secuencia de aminoácidos de la hemoglobina, cuyo resultado es la enfermedad conocida como *anemia drepanocítica.* Esta anemia intensa y hereditaria se genera por un solo cambio en la secuencia aminoacídica dentro de la molécula de hemoglobina: un residuo de valina no polar está presente donde se localizaba en condiciones normales un ácido glutámico cargado. Este cambio en la estructura de la hemoglobina puede tener efectos notables en la forma de los glóbulos rojos y convierte la forma de disco aplanado normal de las células en una forma de hoz (fig. 2-29), con la tendencia a tapar con coágulos los pequeños vasos sanguíneos, lo que provoca dolor y crisis que amenazan la vida. No todos los cambios aminoacídicos tienen tan grave efecto, como lo muestran las diferencias de secuencia aminoacídica en la misma proteína de otros organismos relacionados. El grado en el que los cambios de la secuencia primaria se toleran depende de la proporción en la cual se alteran ya sea el aspecto de la proteína o bien los residuos críticos funcionales.

A principios de la década de 1950, Frederick Sanger y colaboradores de la *Cambridge University* determinaron la primera secuencia aminoacídica de una proteína. Se seleccionó la insulina de vaca para su estudio debido a la disponibilidad y su pequeño tamaño: dos cadenas polipeptídicas de 21 y 30 aminoácidos cada una. La *secuenciación* de la insulina fue una verdadera proeza en el naciente campo de la biología molecular. Reveló que las proteínas, las moléculas más complejas de las células, tenían una subestructura específica definible que no era regular ni repetitiva, como la de los polisacáridos. Cada tipo particular de polipéptido, ya sea la insulina o alguna otra especie, tiene una secuencia precisa de aminoácidos que no varía de una molécula a otra. Con el advenimiento de las técnicas de secuenciación rápida del DNA (véase sección 18.15), la estructura primaria de un polipéptido puede deducirse a partir de la secuencia nucleótida del gen que la codifica. En los pocos años que han transcurrido se determinó la secuencia completa de los genomas de cientos de organismos, incluido el ser humano. Esta información permitirá a los investigadores conocer cada proteína que los organismos pueden elaborar. Sin embargo, traducir en conocimiento la información de la estructura primaria todavía representa un gran reto.

Estructura secundaria Toda la materia existe en el espacio y por lo tanto tiene una estructura tridimensional. Las proteínas se forman mediante uniones entre un gran número de átomos; por consiguiente, su forma es compleja. El término **conformación** se refiere a la disposición tridimensional de los átomos de una molécula, es decir, su organización espacial. La estructura secundaria describe la conformación de partes de la cadena de polipéptidos. Linus Pauling y Robert Corey, del *California Institute of Technology*, llevaron a cabo los primeros estudios acerca de la estructura secundaria de las proteínas. Al estudiar la estructura de péptidos simples que consistían en pocos aminoácidos unidos entre sí, Pauling y Corey concluyeron que las cadenas polipeptídicas existían en conformaciones predefinidas que proveen el número máximo posible de puentes de hidrógeno entre los aminoácidos vecinos.

Se propusieron dos conformaciones. En una de ellas, el esqueleto del polipéptido tomaba la forma de un cilindro, una espiral denominada **hélice alfa (α)** (fig. 2-30*a,b*). La estructura permanece en el lado interno de la hélice y las cadenas laterales se proyectan hacia fuera. La estructura helicoidal se estabiliza por medio de la unión de puentes de hidrógeno entre los átomos de un péptido enlazado y los situados justo arriba y abajo a lo largo de la espiral (fig. 2-30*c*). Los patrones de difracción de rayos X de proteínas verdaderas, determinados en el decenio de 1950, revelaron la existencia de hélices alfa, primero en la proteína queratina del cabello y después en varias proteínas que unen oxígeno, como la mioglobina y la hemoglobina (véase fig. 2-34). Las superficies opuestas de una hélice alfa pueden tener propiedades contrastantes. En las proteínas hidrosolubles, la superficie externa de una hélice alfa contiene con frecuencia residuos polares en contacto con el solvente, en tanto que la superficie enfrentada con el interior posee cadenas laterales no polares.

La segunda conformación que propusieron Pauling y Corey fue la estructura de **hoja beta (β) plegada**, la cual consiste en varios segmentos de un polipéptido que permanecen lado con lado. A diferencia de la estructura de la hélice alfa, el esqueleto de cada segmento de polipéptido (o **cadena beta**) en una hoja beta toma una conformación con dobleces (fig. 2-31*a*). Al igual que la hélice alfa, la lámina beta también se caracteriza por un gran número de puentes de hidrógeno, pero estas uniones son perpendiculares al eje principal de la cadena de polipéptidos y se proyectan de manera transversal desde un lado de la cadena hacia el otro (fig. 2-31*b*). Del mismo modo que la hélice alfa, la lámina beta también se encuentra en muchas proteínas diferentes. Puesto que la cadena de aminoácidos está casi por completo extendida, la lámina beta resiste las fuerzas de tensión (estrés). La seda es una proteína integrada sobre todo por láminas beta;



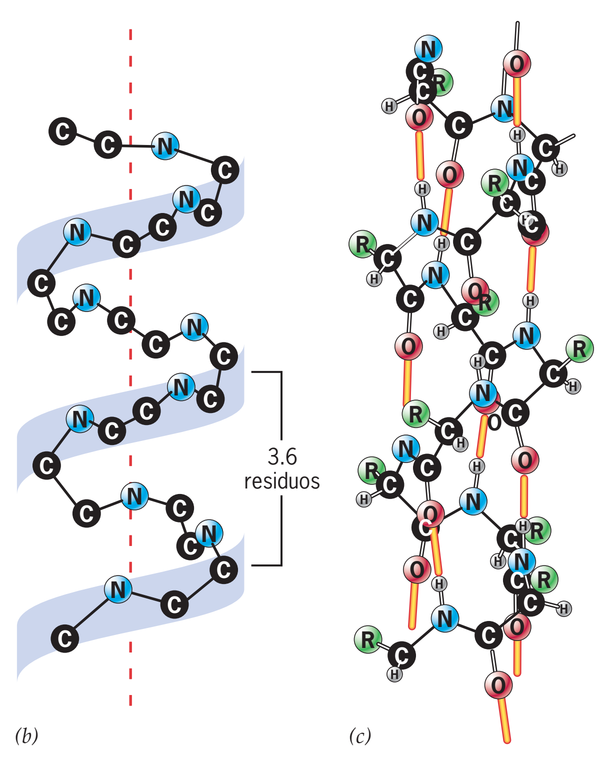


FIGURA 2-30 La hélice alfa. *a*) Linus Pauling (*izquierda*) y Robert Corey con un modelo en madera de la hélice alfa. El modelo tiene una escala de 1 pulgada por Å, que representa una amplificación de 254 millones de veces. *b*) Trayectoria helicoidal alrededor de un eje central que toma el esqueleto polipeptídico en una región de la hélice alfa. Cada vuelta completa (360°) de la hélice corresponde a 3.6 residuos de aminoácidos. La distancia entre los residuos adyacentes es de 1.5 Å. *c*) Configuración de los átomos del esqueleto de la hélice alfa y los puentes de hidrógeno que se forman entre los aminoácidos. Debido a la rotación helicoidal, los enlaces peptídicos de cada cuatro aminoácidos están muy cerca. El acercamiento del grupo carbonilo (C═O) de un enlace peptídico al grupo imino (H—N) de otro enlace peptídico resulta en la formación de puentes de hidrógeno entre ellos. Los puentes de hidrógeno (barras de color naranja) están en esencia paralelas al eje del cilindro y de ese modo sostienen las vueltas de la cadena. (*A*, CORTESÍA DE LOS ARCHIVOS, CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY.)

las fibras de seda deben su resistencia a esta característica estructural. De manera sorprendente, una sola fibra de tela de araña, que tiene la décima parte del grosor de un cabello humano, es cinco veces más resistente que una fibra de acero del mismo peso.

Las porciones de una cadena de polipéptidos no organizada en hélices alfa o láminas beta pueden consistir en bisagras, vueltas, asas o extensiones digitiformes. Con frecuencia éstas son las partes más sensibles de una cadena de polipéptido y los sitios de mayor actividad biológica. Por ejemplo, se sabe de las interacciones específicas de las moléculas de anticuerpo con otras moléculas (antígenos); estas interacciones reciben la mediación

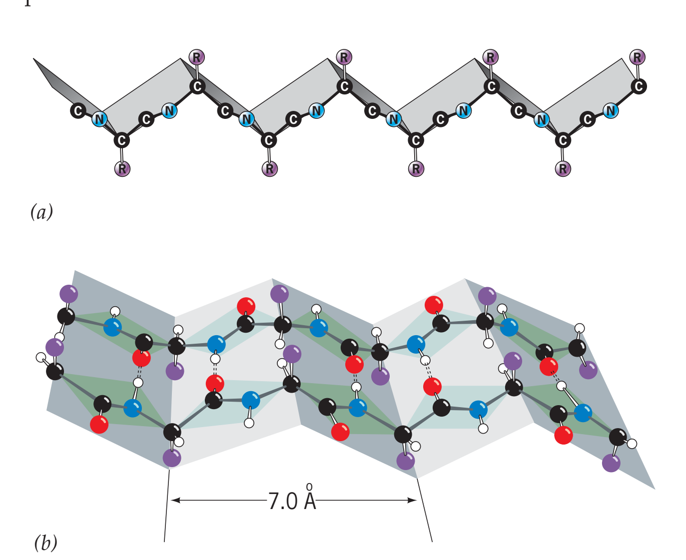


FIGURA 2-31 La hoja β plegada. *a*) Cada polipéptido de una hoja beta asume una conformación extendida pero plegada a la cual se le denomina cadena beta. El plegamiento es consecuencia de la localización de los carbonos alfa por arriba y abajo del plano de la hoja. Las cadenas laterales sucesivas (grupos R en la figura) se proyectan hacia arriba y abajo del esqueleto. La distancia entre los residuos adyacentes es 3.5 Å. *b*) Una hoja beta plegada posee un número de cadenas beta que se encuentran paralelas una a la otra y están unidas por un ordenamiento regular de puentes de hidrógeno entre los grupos carbonilo e imino de los esqueletos contiguos. Los segmentos próximos del esqueleto polipeptídico pueden también estar paralelos (en la misma dirección N-terminal → C-terminal) o antiparalelos (en dirección opuesta N-terminal → C-terminal). (*B*, ILUSTRACIÓN DE IRVING GEIS. IMAGEN DE LA IRVING GEIS COLLECTION/HOWARD HUGHES MEDICAL INSTITUTE. DERECHOS DE HHMI. SÓLO PUEDE REPRODUCIRSE CON AUTORIZACIÓN.)

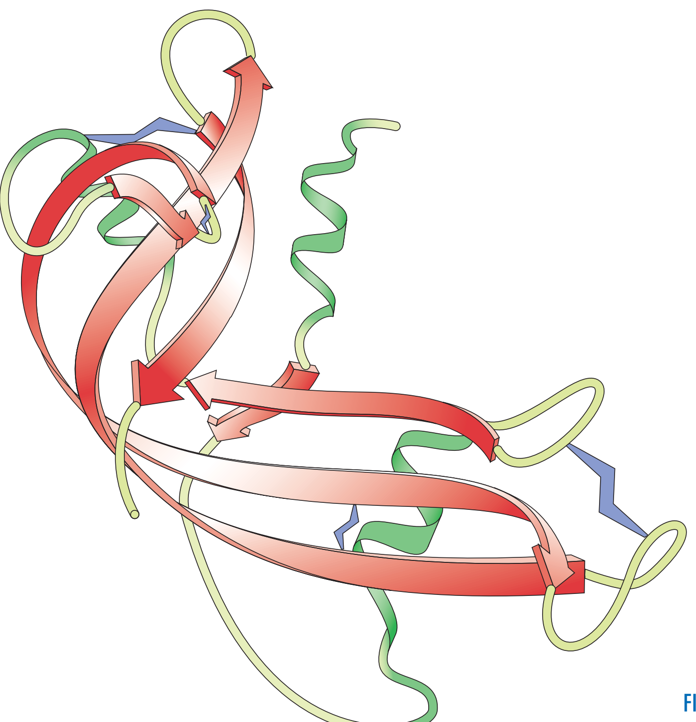


FIGURA 2-32 **Modelo de listón de la ribonucleasa.** Las regiones de una hélice alfa se muestran como espirales y las cadenas beta como listones aplanados con las flechas que indican la dirección N-terminal → C-terminal del polipéptido. Los segmentos de la cadena que no adoptan una estructura secundaria regular (p. ej., una hélice alfa o una cadena beta) consisten sobre todo en asas y vueltas y se muestran en color verde lima. Los puentes disulfuro aparecen en color azul. (Dibujo de Jane S. Richardson.)

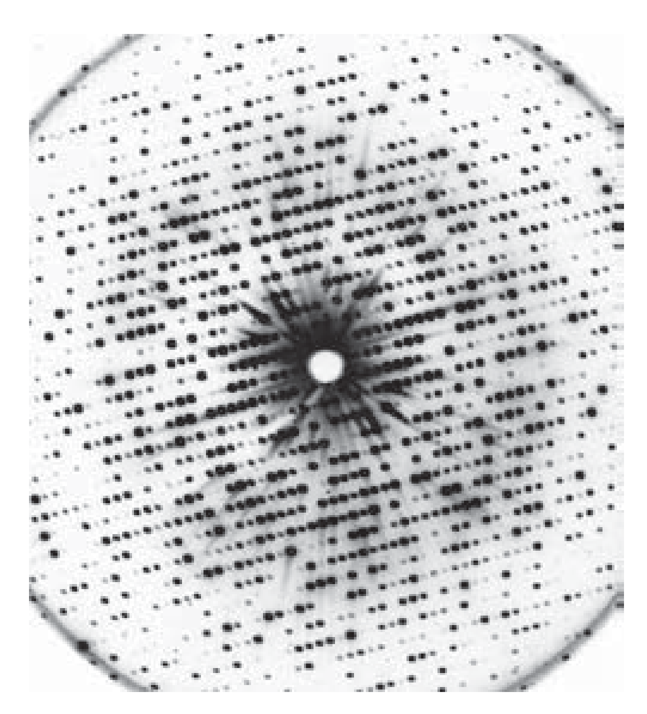


FIGURA 2-33 **Patrón de difracción de rayos X de la mioglobina.** El patrón de manchas se produce a medida que los átomos en el cristal de proteína difractan un haz de rayos X, lo que da lugar a que los rayos X golpeen la película en sitios específicos. La información derivada de la posición e intensidad (oscurecimiento) de las manchas puede usarse para calcular las posiciones de los átomos en la proteína que difracta los rayos, lo cual crea estructuras complejas como la que se muestra en la figura 2-34. (Cortesía de John C. Kendrew.)

de una serie de asas en uno de los extremos de la molécula de anticuerpo (véanse las figuras 17-13 y 17-14). Los diferentes tipos de estructuras secundarias se muestran de manera muy simple en la figura 2-32: las hélices alfa se representan como listones helicoidales, las hojas beta son flechas aplanadas y los segmentos de conexión como cadenas delgadas.

Estructura terciaria El siguiente nivel por arriba de la estructura secundaria es la estructura terciaria, que describe la conformación de la proteína en su totalidad. De esta forma, a la estructura secundaria la estabilizan de manera primaria los puentes de hidrógeno entre los átomos que forman los enlaces peptídicos del esqueleto; la estructura terciaria gana estabilidad por una disposición de uniones no covalentes entre las diferentes cadenas laterales de la proteína. La estructura secundaria se limita por un pequeño número de conformaciones, pero la estructura terciaria es virtualmente ilimitada.

La estructura terciaria detallada de una proteína se determina casi siempre a través de la técnica de **cristalografía de rayos X**.[5] En esta técnica (que se describe con mayor precisión en las secciones 3.2 y 18.8), el cristal de una proteína se bombardea con pequeños haces de rayos X y luego la radiación que es difractada por los electrones de los átomos de la proteína se permite que entre en contacto con una placa sensible a la radiación, o detector, para formar una imagen de manchas, como la que se muestra en la figura 2-33. Cuando estos patrones de difracción se someten a análisis matemáticos complejos, un investigador puede inferir la estructura que produce este patrón.

En los últimos años, a medida que se han determinado más y más estructuras proteínicas, se ha hecho manifiesto que una cantidad sorprendente de proteínas contienen segmentos de longitud considerable que carecen de una conformación definida. En los modelos de la proteína PrP (fig. 1, pág. 66) y las colas de histona (fig. 12.10*c*) se observan ejemplos de proteínas que contienen estos tipos de segmentos no estructurados (o *desordenados*). Las regiones desordenadas de estas proteínas se representan como líneas de trazo discontinuo en las imágenes, lo que expresa el hecho de que estos segmentos del polipéptido pueden estar presentes en muchas posiciones distintas y, por tanto, no pueden estudiarse por cristalografía de rayos X. Tal vez se pregunte el lector si las proteínas que carecen de una estructura plenamente definida podrían tener una función útil. De hecho, estas regiones desordenadas tienen funciones decisivas en procesos celulares vitales, que a menudo implican la unión a DNA o a otras proteínas. De manera notable, estos segmentos con frecuencia experimentan una transformación física tras unirse a una molécula apropiada y entonces se observa que adquieren una estructura plegada definida.

[5] La estructura tridimensional de las proteínas pequeñas se puede determinar por espectroscopia NMR, que no se trata en el texto (véanse revisiones de esta tecnología en el suplemento de julio de *Nat Struct Biol.* 1998, *Nat Struct Biol.* 7:982, 2000, y *Chem Rev.* 104:3541, 2004).
En la figura 1*a*, pág. 66, se muestra una estructura derivada de NMR.

La mayoría de las proteínas puede clasificarse con base en su conformación estructural en **proteínas fibrosas**, las cuales poseen una estructura muy alargada, o **proteínas globulares**, que tienen una forma compacta. Casi todas las proteínas que actúan como materiales estructurales fuera de las células vivas son fibrilares, como las colágenas y elastinas del tejido conjuntivo; las queratinas del cabello, piel y uñas; y también las fibras de la seda. Estas proteínas resisten las fuerzas de corte a las cuales se exponen. En cambio, la mayor parte de las proteínas intracelulares corresponde a proteínas globulares.

Mioglobina: la primera proteína globular cuya estructura terciaria se determinó Las cadenas polipeptídicas de las proteínas globulares son plegadas y empaquetadas en formas complejas. Los puntos distantes en su estructura lineal de aminoácidos pueden aproximarse unos a otros mediante varios tipos de uniones. No fue sino hasta 1957 que se dispuso de un modelo de estructura terciaria para una proteína globular. El trabajo lo realizaron John Kendrew y colaboradores de la *Cambridge University*, luego de emplear patrones de difracción de rayos X como los que se muestran en la figura 2-33. La proteína que reportaron fue la mioglobina.

Las funciones de la mioglobina en el tejido muscular son las de un almacén de oxígeno; la molécula de oxígeno se une a un átomo de hierro en el centro del grupo hemo. (El hemo es un ejemplo de un *grupo prostético*, esto es, una porción de la proteína que no está compuesta de aminoácidos, la cual se agrega a la cadena polipeptídica después que ésta se ensambla en el ribosoma.) Es el grupo hemo de la mioglobina el que suministra al tejido muscular su color rojo. El primer informe de la estructura de la mioglobina provino de un perfil de baja resolución suficiente para revelar que la molécula era compacta (globular) y que la cadena de polipéptidos estaba doblada sobre sí misma en una disposición compleja. No fue evidente la regularidad o simetría dentro de la molécula, tal y como se observó en la descripción anterior de la doble hélice del DNA. Esto no fue sorprendente si se considera la función específica del DNA y las funciones diversas de las moléculas de proteína.

El perfil crudo más temprano de la mioglobina reveló ocho estructuras semejantes a bastoncillos de hélice alfa en límites de siete a 24 aminoácidos de longitud. No obstante, cerca de 75% de los 153 aminoácidos en las cadenas polipeptídicas tenía una conformación de hélice alfa. Este es un porcentaje muy alto y poco usual comparado con otras proteínas ya examinadas. No se encontraron estructuras beta plegadas. Análisis subsecuentes de la mioglobina mediante difracciones de rayos X adicionales mostraron una imagen mucho más detallada de la molécula (figs. 2-34*a* y 3-16). Por ejemplo, se demostró que el grupo hemo está situado dentro de un paquete formado por los lados hidrófobos de las cadenas que promueven la unión del oxígeno sin la oxidación (pérdida de electrones) de los átomos de hierro. La mioglobina no contiene enlaces de disulfuro; la estructura terciaria de la proteína permanece junta casi de manera exclusiva por interacciones no covalentes. Se piensa que todos los enlaces no covalentes (puentes de hidrógeno, enlaces iónicos y fuerzas de van der Waals) observados ocurren entre las cadenas laterales dentro de las proteínas (fig. 2-35). En cambio con la mioglobina, la mayoría de las proteínas globulares contiene hélices alfa y estructuras beta. Como se reveló en estudios anteriores, cada proteína tiene una estructura terciaria única que puede correlacionarse con su secuencia aminoacídica y su función biológica.

(a)

(b)

FIGURA 2-34 Estructura tridimensional de la mioglobina. *a*) Estructura terciaria de la mioglobina de ballena. Casi todos los aminoácidos son parte de las hélices alfa. Las regiones no helicoidales ocurren sobre todo como vueltas, donde las cadenas polipeptídicas cambian de dirección. La posición del grupo hemo se indica en rojo. *b*) Estructura tridimensional de la mioglobina (el grupo hemo se representa en rojo). Se muestran las posiciones de todos los átomos de la molécula, diferentes del hidrógeno. (*A*, ILUSTRACIÓN DE IRVING GEIS. IMAGEN DE IRVING GEIS COLLECTION/HOWARD HUGHES MEDICAL INSTITUTE. DERECHOS DE HHMI. REPRODUCIDA CON AUTORIZACIÓN; *B*, KEN EDWARD/PHOTO RESEARCHERS.)

Dominios de proteínas A diferencia de la mioglobina, la mayoría de las proteínas de los eucariotas están compuestas de dos o más módulos espacialmente diferenciados, o **dominios**, que se pliegan independientemente unos de otros. Por ejemplo, la enzima de los mamíferos fosfolipasa C, mostrada en la parte central de la figura 2-36, consta de cuatro dominios bien delimitados, que se muestran con colores distintos en el dibujo. Los diferentes dominios de un polipéptido a menudo representan partes

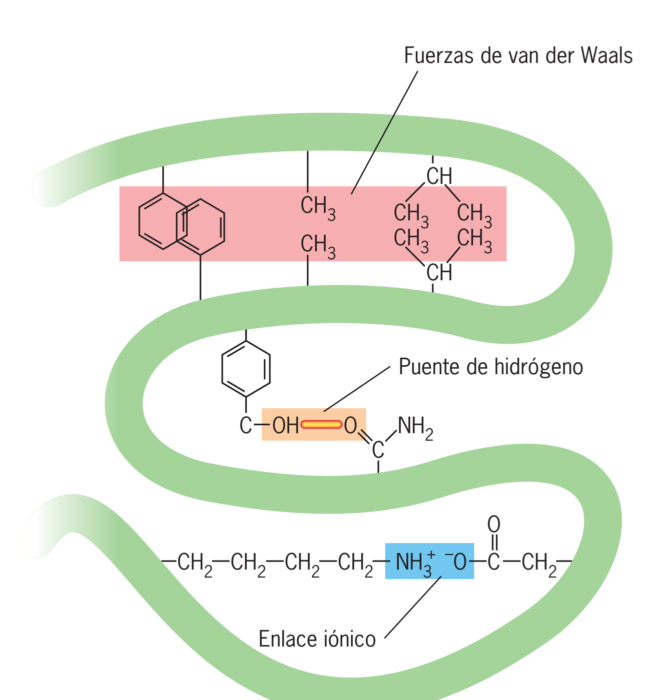


FIGURA 2-35 **Tipos de enlaces no covalentes que mantienen la conformación de las proteínas.**

que funcionan de manera semiindependiente. Así, podrían unirse a diferentes factores, como una coenzima y un sustrato o una cadena de DNA y otra proteína, o bien podrían moverse con relativa independencia uno de otro. Muchos polipéptidos contienen más de un dominio y se piensa que han surgido durante la evolución por la fusión de genes que codificaban diferentes proteínas ancestrales, y que cada dominio representa una parte que alguna vez fue una molécula separada. Cada dominio de la molécula de fosfolipasa C de mamífero, por ejemplo, se ha identificado como una unidad homóloga en otra proteína (fig. 2-36). Algunos dominios se han identificado sólo en una proteína o en unas pocas de ellas. Otros han sido ampliamente "barajados" (sometidos a intercambio aleatorio de secuencias) en el transcurso de la evolución, y aparecieron en una variedad de proteínas cuyas diferentes regiones muestran pocos o nulos indicios de una relación evolutiva. Esta variación de dominios crea proteínas con combinaciones de actividades únicas. En promedio, las proteínas de mamífero tienden a ser grandes y contienen más dominios que las proteínas de los organismos menos complejos, por ejemplo, las moscas de la fruta y las levaduras.

En años anteriores se ha despertado un gran interés por la estructura de las proteínas. Ya se han reportado casi 25 000 estructuras tridimensionales de proteínas y los avances recientes en las técnicas de cristalografía y difracción de rayos X han llevado a un gran incremento del número de estructuras notificadas cada año. Aun así, la inmensa mayoría de las estructuras descritas en fecha reciente es similar a las proteínas cuya estructura ya se determinó. Como se discute en la página 74, las proteínas (o los dominios de los cuales forman parte) se pueden agrupar en familias cuyos miembros tienen en general una estructura similar. Los dominios que están agrupados dentro de las mismas familias poseen un esqueleto que se pliega en una configuración regularmente similar y se dice que comparten un **plegamiento** común. Así como los secuenciadores quieren describir todos los genes en un genoma, los biólogos estructurales esperan describir todos los diferentes plegamientos que existen en la naturaleza. Existe un gran desacuerdo acerca de cuántas familias distintas constituyen el universo proteínico: las estimaciones varían desde menos de 2 000 hasta más de 10 000. Un esfuerzo organizado al que se dio el nombre de Iniciativa Estructura Proteínica tiene la finalidad de determinar las estructuras de la mayor cantidad posible de plegamientos en los siguientes años. Una vez que se ha determinado una estructura representativa de un plegamiento dado, suele ser posible predecir la estructura de otros miembros de la familia a partir de su secuencia de aminoácidos usando técnicas mejoradas en modelación por computadora.

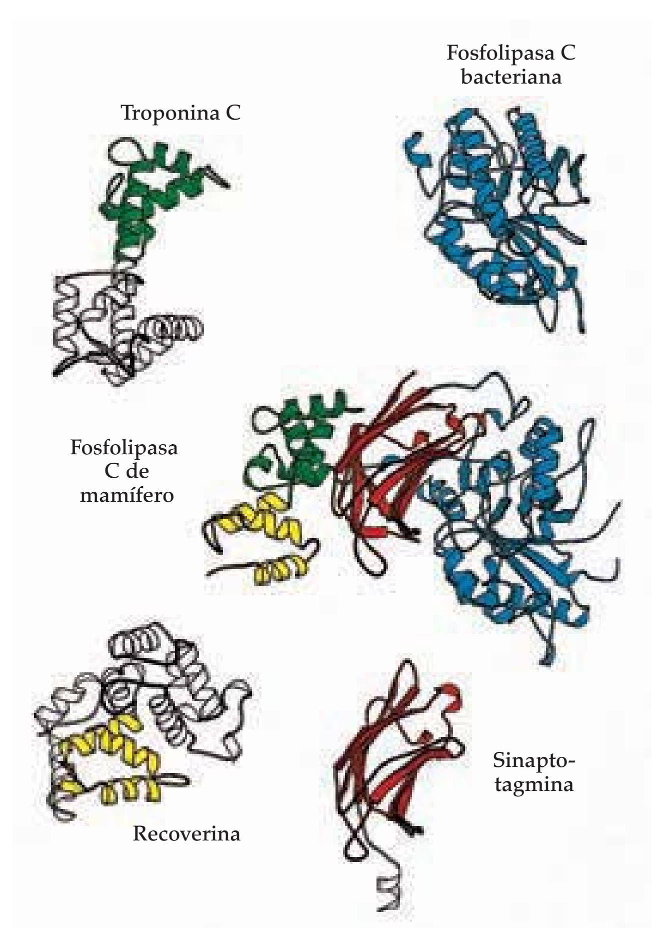


FIGURA 2-36 **Las proteínas se integran con unidades estructurales o dominios.** La enzima fosfolipasa C de mamífero se compone de cuatro dominios, indicados en diferentes colores. El dominio catalítico de la enzima se muestra en azul. Cada uno de los dominios de esta enzima puede encontrarse de forma independiente en otras proteínas como se indica con el mismo color. (Tomada de Liisa Holm y Chris Sander, Structure 5:167, 1997.)

Cambios dinámicos dentro de las proteínas Pese a que la estructura que se observa mediante cristalografía de rayos X posee detalles sutiles, se trata de imágenes congeladas en el tiempo. En cambio, las proteínas no son estáticas o rígidas, sino capaces de ejercer movimientos considerables en su estructura interna.

Debido a que son pequeñas, con un tamaño de nanómetros, las proteínas pueden influirse en grado notorio por la energía de su ambiente. Las fluctuaciones aleatorias de pequeña escala de los ordenamientos de los enlaces dentro de una proteína crean un incesante movimiento térmico dentro de la molécula. Las técnicas de espectroscopia, como la resonancia magnética nuclear, pueden vigilar los movimientos dinámicos dentro de las proteínas y revelan cambios en los puentes de hidrógeno, movimientos de tipo ondulatorio de las cadenas laterales y rotaciones completas de los anillos aromáticos de residuos de tirosina y fenilalanina. El papel que dichos movimientos pueden tener en las funciones de una proteína lo ilustran los estudios de la enzima acetilcolinesterasa, encargada de la degradación de las moléculas de acetilcolina que se liberan después de la transmisión de un impulso de una célula nerviosa a la siguiente (sección 4.8). Cuando se reveló la estructura terciaria de la acetilcolinesterasa por cristalografía de rayos X, no resultó evidente una vía o un medio para que las moléculas de acetilcolina encajaran en el sitio catalítico de la enzima, el cual se situó en la parte baja de una cavidad profunda de la molécula. De hecho, un gran número de aminoácidos con cadenas laterales bloqueó la pequeña entrada al sitio. Mediante supercomputadoras de alta velocidad, los investigadores simularon los movimientos azarosos de los miles de átomos dentro de la enzima. Estas simulaciones indicaron que los movimientos dinámicos de las cadenas laterales dentro de la proteína debían permitir la abertura y el cierre rápidos de una "compuerta" para posibilitar la entrada de las moléculas de acetilcolina y difundirse dentro del sitio catalítico de la enzima (fig. 2-37).

Los movimientos predecibles (no aleatorios) dentro de una proteína que se activan por la unión de una molécula específica se describen como **cambios conformacionales**. Una comparación de los polipéptidos se muestra en la figura 3*a* y *b* en la página 80 y señala los notables cambios conformacionales que ocurren en la proteína bacteriana (GroEL) cuando interactúa con otra proteína (GroES). Virtualmente cada actividad en la cual una proteína toma parte se acompaña de cambios conformacionales dentro de la molécula (véanse ejemplos en http://molmovdb.org). En la miosina estos cambios que tienen lugar durante la contracción muscular se muestran en las figuras 9-60 y 9-61. En este caso, la unión de la miosina con una molécula de actina propicia una pequeña rotación (20°) de la cabeza de miosina, que resulta en un movimiento de 50 a 100 Å del filamento de actina adyacente. La importancia de este suceso dinámico puede reconocerse si se considera que los movimientos que puede realizar el cuerpo son consecuencia de los efectos aditivos de millones de cambios conformacionales que regularmente suceden dentro de las proteínas contráctiles de los músculos.

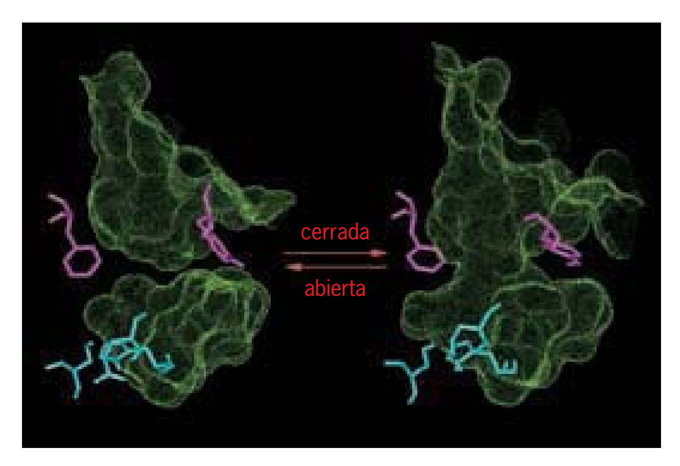
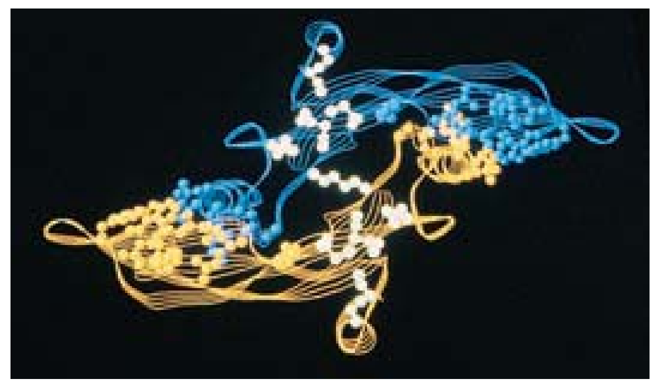
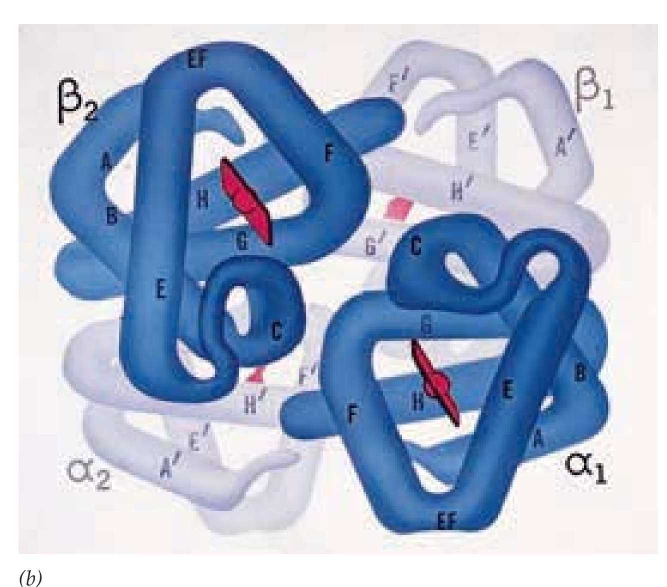


FIGURA 2-37 Movimientos dinámicos dentro de la enzima acetilcolinesterasa. Una porción de la enzima se representa aquí en dos conformaciones diferentes: a) una conformación cerrada (izquierda) donde la entrada al sitio catalítico está bloqueada por la presencia de anillos aromáticos que son los residuos de tirosina y fenilalanina de las cadenas laterales (se muestran en morado) y b) una conformación abierta (derecha) en la que los anillos aromáticos de estas cadenas laterales se han alejado, con lo cual se abre la "puerta" para permitir la entrada de las moléculas de acetilcolina al sitio catalítico. Estas imágenes se representan mediante programas para computadora que toman en cuenta la información almacenada acerca de los átomos que forman la molécula, incluidos la longitud y los ángulos de los enlaces, atracción y repulsión electrostáticas, fuerzas de van der Waals, etc. A partir de esta información, los investigadores son capaces de simular los movimientos de varios átomos, lo cual provee imágenes de las conformaciones que las proteínas pueden asumir. Una animación de esta imagen puede encontrarse en la Web en http://mccammon.ucsd.edu. (Cortesía de J. Andrew McCammon.)

Estructura cuaternaria Mientras muchas proteínas como la mioglobina se integran con tan sólo una cadena polipeptídica, la mayoría incluye más de una cadena, o **subunidad**. Las subunidades pueden vincularse mediante enlaces covalentes similares a los puentes disulfuro, pero más a menudo se aproximan entre sí por medio de interacciones no covalentes, como ocurre de manera regular entre las "uniones" hidrófobas en las superficies complementarias de los polipéptidos que están muy próximos. Las proteínas compuestas de subunidades poseen una **estructura cuaternaria**. Según sea la proteína, las cadenas polipeptídicas pueden ser idénticas o diferentes. Una proteína compuesta de dos subunidades idénticas se describe como un *homodímero*, mientras que una proteína integrada con dos subunidades no idénticas es un *heterodímero*. En la figura 2-38*a* se muestra un dibujo de listón de una proteína homodimérica. Las dos subunidades de la proteína se representan en diferentes colores y se señalan los residuos hidrófobos que forman los sitios complementarios de contacto. La proteína de subunidades múltiples mejor estudiada es la hemoglobina, la proteína que porta O_2 en los glóbulos rojos. Una molécula de hemoglobina humana consiste en dos polipéptidos de globina alfa y dos de globina beta (fig. 2-38*b*) unidos a una sola molécula de oxígeno. La dilucidación de la estructura dimensional de la hemoglobina de Max Perutz de la *Cambridge University* en 1959 fue uno de los primeros hitos de la biología molecular. Perutz demostró que cada uno de los cuatro polipéptidos de globina de una molécula de hemoglobina tiene una estructura terciaria similar a la de la mioglobina, un hecho que de manera notable sugiere que las dos proteínas habían evolucionado a partir de un polipéptido ancestral común con un mecanismo común de unión al oxígeno. Perutz también comparó la estructura de las versiones de hemoglobina oxigenada y desoxigenada. Al hacerlo descubrió que la unión del oxígeno se acompañó del movimiento del átomo de hierro unido, muy cerca del plano del grupo hemo. Este movimiento sin consecuencias aparentes en la posición de un solo



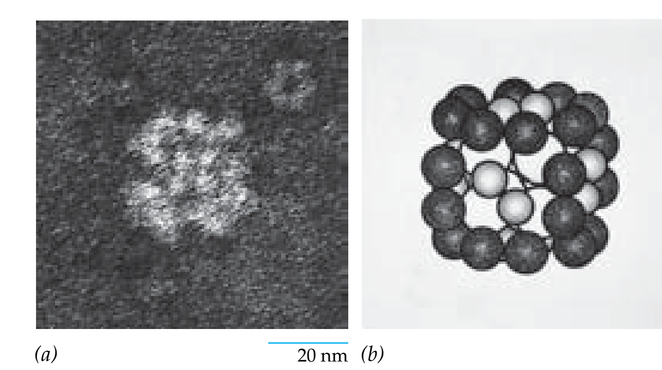
(a)



(b)

FIGURA 2-38 Proteínas con estructura cuaternaria. *a*) Dibujo del factor de crecimiento transformador β2 (TGF-β2), una proteína que es un dímero compuesto de dos subunidades idénticas. Las dos subunidades se muestran en colores amarillo y azul. Las cadenas laterales de cisteína y los puentes disulfuro se muestran en blanco. Las esferas de color amarillo y azul son los residuos hidrófobos que forman la interfaz entre las dos subunidades. *b*) Representación de la molécula de hemoglobina, que posee dos cadenas de globina alfa y dos de globina beta unidas por enlaces no covalentes. Cuando los cuatro polipéptidos de globina se ensamblan en una molécula completa de hemoglobina, la cinética de unión y liberación de O_2 son totalmente diferentes respecto de las observadas en los polipéptidos aislados. Esto se debe a que la unión del O_2 a un polipéptido induce un cambio conformacional en los otros polipéptidos que alteran su afinidad por las moléculas de O_2. (*A*, Reimpresa con autorización de S. Daopin, et al., Science 257:372, 1992, cortesía de David R. Davies. © 1992 American Association for the Advancement of Science; *B*, Ilustración de Irving Geis. Imagen de Irving Geis Collection/ Howard Hughes Medical Institute. Derechos de HHMI. Reproducida con autorización.)

átomo, que empujaba a una hélice alfa en la cual estaba conectado el hierro, precipitó una serie de movimientos más grandes dentro de las subunidades y entre ellas. Este hallazgo reveló, por primera vez, que las complejas funciones de las proteínas pueden efectuarse mediante pequeños cambios en su conformación.



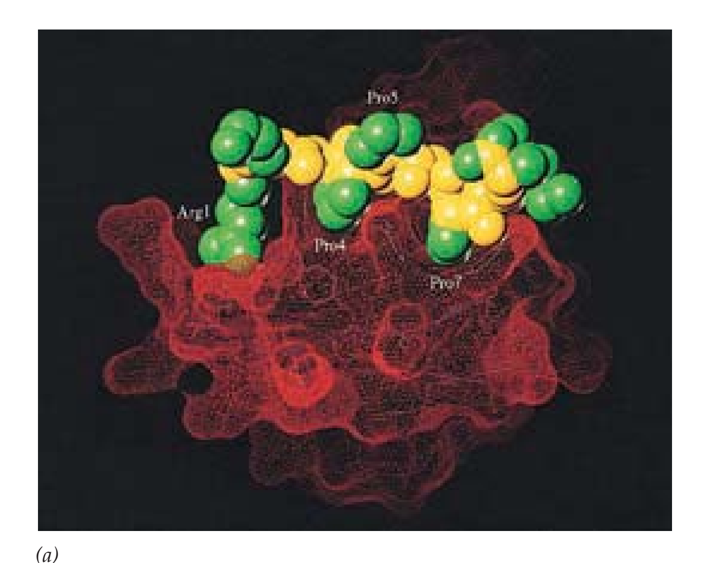
(a) 20 nm *(b)*

FIGURA 2-39 Deshidrogenasa de piruvato: un complejo multiproteico. *a*) Micrografía electrónica de una tinción negativa del complejo deshidrogenasa de piruvato aislado de *E. coli*. Cada complejo contiene 60 cadenas polipeptídicas constituidas por tres enzimas diferentes. Su masa molecular se acerca a los cinco millones de daltones. *b*) Un modelo del complejo deshidrogenasa de piruvato. El corazón del complejo posee un grupo parecido a un cubo de moléculas de transacetilasa de dihidrolipoílo. Los dímeros de la deshidrogenasa de piruvato (esferas negras) están distribuidos de manera simétrica hacia los bordes del cubo y los dímeros de la deshidrogenasa de dihidrolipoílo (esferas grises pequeñas) se encuentran en las caras del cubo. (Cortesía de Lester J. Reed.)

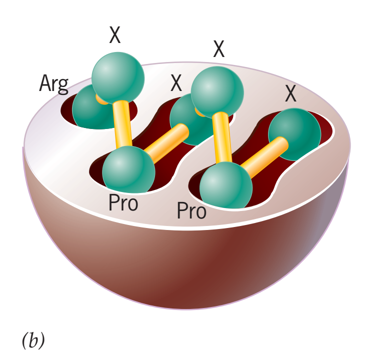
Interacciones proteína-proteína Aunque la hemoglobina consta de cuatro subunidades, todavía se considera una proteína simple con una sola función. Se conocen muchos ejemplos en los cuales diferentes proteínas, cada una con función específica, se reúnen para crear un **complejo multiproteico** mucho más grande. Unos de los primeros complejos multiproteicos que se describieron y estudiaron fue la enzima deshidrogenasa de piruvato de la bacteria *Escherichia coli*, que posee 60 cadenas de polipéptidos correspondientes a tres enzimas diferentes (fig. 2-39). La enzima que lleva a cabo este complejo cataliza una serie de reacciones que conectan dos vías metabólicas, la glucólisis y el ciclo del ácido tricarboxílico (véase fig. 5-7). Debido a que las enzimas están vinculadas, el producto de una enzima puede conducirse de manera directa a la próxima enzima en la secuencia sin diluirse en el medio acuoso de la célula.

Los complejos multiproteicos que se forman dentro de la célula no están en todos los casos ensamblados de manera estable, como el complejo de la deshidrogenasa de piruvato. De hecho, como regla general, la mayoría de las proteínas interactúan con otras proteínas en patrones muy dinámicos; la vinculación y disgregación dependen de las condiciones intracelulares en un tiempo particular. Las proteínas que interactúan tienden a mostrar superficies complementarias. Muchas veces una porción saliente de una molécula se inserta en la oquedad de su proteína complementaria. Después que las dos moléculas están en contacto estrecho, sus interacciones se estabilizan por medio de enlaces de tipo no covalente.

La sección que aparece en color rojizo en la figura 2-40*a* se conoce como dominio SH3 y se encuentra como parte de más de 200 diferentes proteínas participantes en la señalización molecular. La superficie de un dominio SH3 contiene pequeños "receptáculos" hidrófobos que ocupan "estructuras" complementarias en forma de pequeñas proyecciones de otra proteína (fig. 2-40*b*). Se ha identificado un gran número de dominios estruc-



(a)



(b)

FIGURA 2-40 Interacciones proteína-proteína. *a*) Un modelo que ilustra las superficies moleculares complementarias de las porciones de dos proteínas que interactúan. La molécula coloreada de rojo es un dominio SH3 de la enzima cinasa 3-OH de fosfatidilinositol, cuya función se analiza en el capítulo 15. Este dominio se une de modo específico a una variedad de péptidos que contienen prolina, como el que se muestra con el modelo de volumen completo en la parte superior de la figura. Están indicados los residuos de prolina en el péptido, que se hallan en paquetes hidrófobos en la superficie de la enzima. El esqueleto polipeptídico del péptido aparece en amarillo y las cadenas laterales en verde. *b*) Modelo esquemático de la interacción entre un dominio SH3 y un péptido que muestra la manera en la cual ciertos residuos del péptido se encajan en los paquetes hidrófobos en el dominio SH3. (*A*, TOMADA DE HONGTAO YU Y STUART SCHREIBER, CELL 76:940, 1994, CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS.)

turales diferentes que, como el dominio SH3, actúan como adaptadores para mediar interacciones entre las proteínas. En muchos casos, las interacciones proteína-proteína se regulan por modificaciones, como la adición de grupos fosfato a un aminoácido clave, el cual puede incrementar o disminuir de manera considerable su capacidad para unirse a una proteína complementaria. A medida que se han descubierto más y más actividades moleculares complejas, ha resultado evidente la relevancia de las interacciones entre proteínas. Por ejemplo, procesos tan diversos como la síntesis de DNA, la formación de ATP y el procesamiento de RNA se llevan a cabo mediante "máquinas moleculares" formadas por un gran número de proteínas interactuantes, algunas de las cuales establecen interrelaciones estables y otras uniones transitorias. En fecha reciente se han purificado varios cientos de complejos proteínicos distintos en estudios a gran escala con levadura.

La mayoría de los investigadores que estudian las interacciones proteína-proteína busca determinar si una proteína se relaciona y trabaja con otra y conocer las interacciones físicas con otras proteínas, esto es, las interacciones entre una proteína X y otra Y. Estas interrogantes pueden resolverse mediante una técnica llamada sistema de dobles híbridos en levaduras (Y2H), que se discute en la sección 18-7 y se ilustra en la figura 18-27. En esta técnica, los *genes* que codifican las dos proteínas bajo investigación se introducen en la misma célula de levadura. Si las células de levadura son positivas para una proteína en particular, indicado por un cambio obvio de color en las células de levadura, entonces las dos proteínas en cuestión interactúan dentro del núcleo celular de la levadura.

Las interacciones entre proteínas suelen estudiarse una a la vez, para obtener el tipo de datos que se observa en la figura 2-40. En años recientes, varios grupos de investigación se han dado a la tarea de estudiar dichas interacciones a una escala global. Por ejemplo, un equipo podría desear conocer todas las interacciones que ocurren entre las aproximadamente 14 000 proteínas codificadas por el genoma de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Ahora que se ha secuenciado el genoma entero de este insecto, virtualmente cada uno de los genes presentes en el genoma está disponible como un segmento individual de DNA que puede clonarse y usarse como convenga. En consecuencia, debe ser posible someter a prueba todas las proteínas codificadas por el genoma de esa mosca, dos al mismo tiempo, en busca de posibles interacciones en un sistema Y2H. En un estudio de este tipo se informó que, de los millones de posibles combinaciones, se detectaron 20 000 interacciones entre 7 048 proteínas de mosca de la fruta sometidas al ensayo.

A pesar de que el ensayo Y2H fue el más empleado para el estudio de las interacciones proteína-proteína en los pasados 15 años, se trata de un ensayo indirecto (véase fig. 18-27) y son comunes los errores. Por un lado, un gran porcentaje de interacciones que se sabe ocurren entre proteínas específicas no se detecta en estos tipos de experimentos. En otras palabras, el ensayo Y2H produce un número significativo de falsos negativos. También se sabe que este ensayo arroja una elevada proporción de falsos positivos, esto es, indica que dos proteínas pueden interactuar cuando otros estudios han demostrado que no lo hacen en las condiciones normales de la célula. En el estudio de las proteínas de la mosca de la fruta descrito antes, los autores usaron análisis por computadora para estrechar los resultados desde las 20 000 interacciones originales hasta unas 5 000 interacciones en las que tenían gran confianza. En total, se estima que, en promedio, cada proteína codificada en el genoma de un organismo eucariótico interactúa con alrededor de cinco proteínas afines distintas. Según este estimado, las proteínas humanas podrían participar en unas 125 000 interacciones distintas.

Los resultados de los estudios a gran escala acerca de las interacciones proteína-proteína pueden mostrarse en la forma de una red, como la que se ilustra en la figura 2-41. Esta figura representa las posibles compañeras de unión de las diversas proteínas de levadura que contienen un dominio SH3 (véase fig. 2-40*a*) e ilustra las complejidades de tales interacciones al nivel de un organismo completo. En esta figura específica se muestran

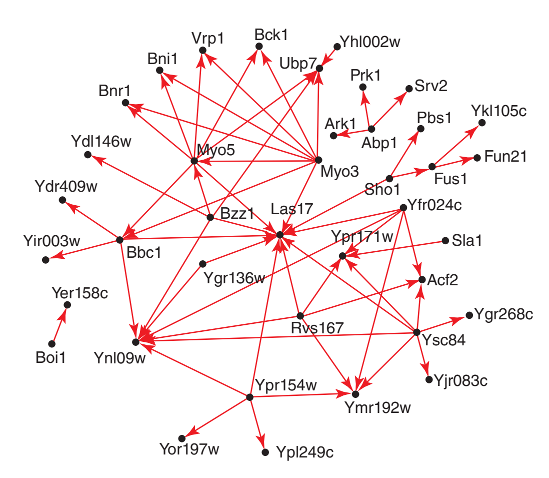


FIGURA 2-41 **Una red de interacciones proteína-proteína.** Cada línea roja representa una interacción entre dos proteínas de levadura, que se indican por los puntos negros con nombre. En cada caso, la flecha apunta desde una proteína del dominio SH3 hasta una proteína blanco con la cual se puede unir. Las 59 interacciones representadas aquí se identificaron mediante dos tipos diferentes de técnicas que miden las interacciones proteína-proteína. (Tomada de A. H. Y. Tong, et al., Science 295:323, 2002. Copyright © 2002 American Association for the Advancement of Science.)

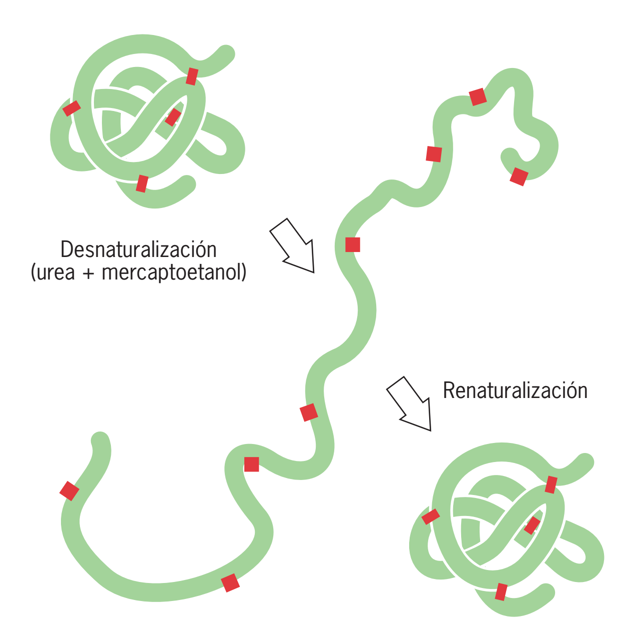


FIGURA 2-42 **Desnaturalización y renaturalización de la ribonucleasa.** Una molécula de ribonucleasa nativa se reduce y sufre una desnaturalización con mercaptoetanol beta y urea 8 M (se indican los puentes disulfuro intramoleculares). Después de la eliminación de estos componentes, la proteína se renaturaliza de manera espontánea. (Tomada de C. J. Epstein, R. F. Goldberger y C. B. Anfinsen, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28:439, 1963.)

sólo las interacciones detectadas por dos métodos del todo diferentes (la técnica Y2H y otra), lo que permite extraer conclusiones mucho más confiables que las basadas en una sola técnica.

Además de obtener una larga lista de interacciones *potenciales*, ¿qué más puede aprenderse de las actividades celulares en estos experimentos a gran escala? De manera notoria, estos estudios proveen un camino para continuar la investigación. El proyecto de la secuenciación del genoma ha suministrado a los científicos la secuencia aminoacídica de una gran cantidad de proteínas cuya existencia se desconocía. ¿Qué función desempeñan estas proteínas? Una forma de determinar la función de las proteínas consiste en identificar otras proteínas con las que se vinculan. Si, por ejemplo, una proteína conocida participa en la replicación del DNA, y se demuestra que una proteína desconocida interacciona con la proteína conocida, entonces es presumible suponer que la segunda también interviene en la estructura de replicación del DNA. De esta forma, a pesar de las limitaciones, estos estudios de Y2H de gran escala (y otros que utilizan diferentes métodos) proveen un punto de inicio para estudiar una miríada de proteínas cuyas interacciones se desconocen y cada una de estas interacciones puede llevar a los investigadores a descubrir nuevos procesos biológicos ignorados.

Plegamiento de proteínas El descubrimiento de la estructura terciaria de la mioglobina al final de la década de 1950 hizo posible advertir la complejidad de la estructura de las proteínas. Sin embargo, surgió entonces una pregunta relevante: ¿cómo se realiza el complejo y asimétrico proceso del plegamiento dentro de la célula? El primer indicio para resolver esta interrogante apareció luego de que Christian Anfinsen de los *National Institutes of Health* observara en 1956 el tipo serendipia. Anfinsen estudiaba las propiedades de la ribonucleasa A, una pequeña enzima que tiene una cadena polipeptídica de 124 aminoácidos con cuatro puentes disulfuro que unen porciones diferentes de la molécula. Por lo general, los puentes disulfuro de una proteína se rompen (se reducen) al agregar un agente reductor, como el mercaptoetanol (CH_3CH_2SH), que convierte cada puente disulfuro en un par de grupos sulfihidrilo (—SH) (véase el dibujo de la página 53). Para hacer todos los puentes disulfuro accesibles al agente reductor, Anfinsen descubrió que primero debía desnaturalizar de forma parcial la molécula. El desplegamiento o desorganización de una proteína se conoce como **desnaturalización** y puede generarla una gran variedad de compuestos, entre ellos detergentes, solventes orgánicos, radiación, calor y compuestos como la urea y el cloruro de guanidina, los cuales interfieren con diferentes interacciones que estabilizan la estructura terciaria de la proteína.

Cuando Anfinsen trató moléculas de ribonucleasa con mercaptoetanol y urea concentrada, encontró que la preparación perdía toda su actividad enzimática, lo cual sería esperable si las moléculas de proteína se desnaturalizaran. Cuando removió la urea y el mercaptoetanol de la preparación, halló, para su sorpresa, que las moléculas recuperaban de nueva cuenta su actividad enzimática normal. Las moléculas de ribonucleasa activa que se habían plegado otra vez a partir de la proteína no plegada fueron indistinguibles estructural y funcionalmente de las que se plegaron de modo correcto (de manera específica la forma **nativa**), esto es, las moléculas presentes al inicio del experimento (fig. 2-42). Después de exhaustivos estudios de estos fenómenos, Anfinsen concluyó que la secuencia lineal de aminoácidos contenía toda la información requerida para la formación de la conformación polipeptídica tridimensional. Es decir, la ribonucleasa es capaz de **autoensamblarse**. Como se analiza en el siguiente capítulo, los sucesos tienden a progresar hacia estados de baja energía. De acuerdo con este concepto, la

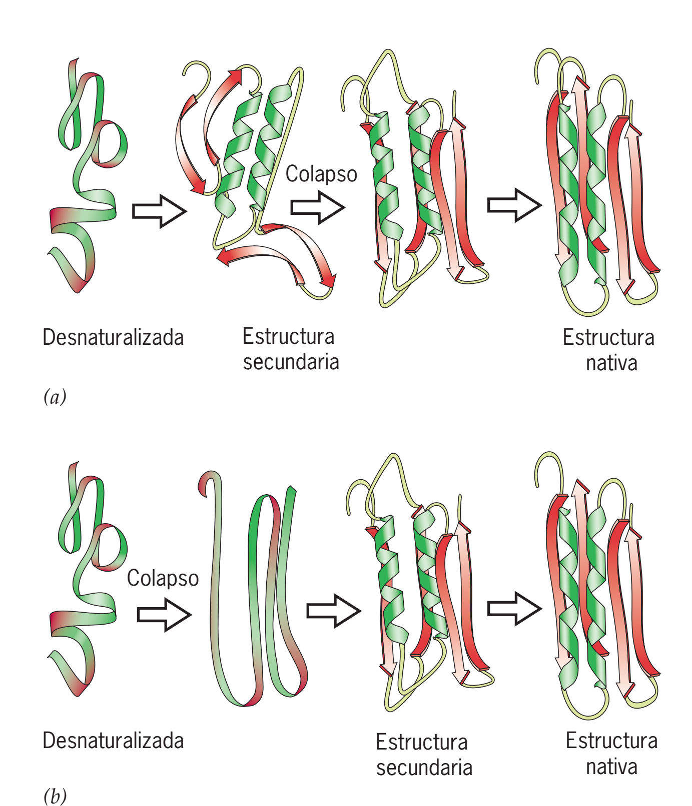


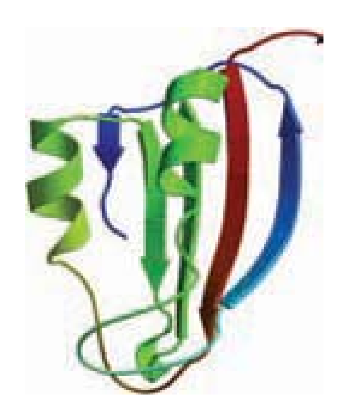
FIGURA 2-43 **Dos vías alternativas** por medio de las cuales una proteína recién sintetizada o desnaturalizada podría adoptar su conformación nativa. Los segmentos rizados representan las hélices alfa y las flechas los segmentos beta.

estructura terciaria que una cadena peptídica asume después de plegarse es la estructura con menor energía, lo cual convierte a ésta en la estructura más estable en términos termodinámicos que puede formar esta cadena.

Se han suscitado numerosas controversias en el estudio del plegamiento de proteínas; una de ellas concierne a los tipos de sucesos que ocurren en varios estados durante el proceso de plegamiento. Para fines de simplicidad, aquí se restringe la exposición a proteínas "sencillas", como la ribonucleasa, que constan de un solo dominio. En el proceso mostrado en la figura 2-43*a*, el plegamiento de proteínas lo inician interacciones entre residuos contiguos que posibilitan la formación de gran parte de la estructura secundaria de la molécula. Una vez que las hélices alfa y las hojas beta plegadas se forman, el plegamiento posterior depende de interacciones hidrófobas que fuerzan los residuos no polares juntos en el núcleo central de la proteína. De acuerdo con el esquema modificado que aparece en la figura 2-43*b*, el suceso primario principal en el plegamiento de proteínas es el colapso del polipéptido para formar una estructura compacta y sólo entonces se desarrolla una estructura secundaria de importancia. Estudios recientes indican que las dos vías mostradas en la figura 2-43 permanecen en extremos opuestos y que la mayoría de las proteínas probablemente se pliegue por un esquema "a mitad del camino" en el cual la formación de la estructura secundaria y la compactación ocurren de manera simultánea. Estos eventos iniciales del plegamiento llevan a la formación de una estructura transitoria parcialmente plegada que se asemeja a la proteína nativa pero carece de muchas de las interacciones específicas entre las cadenas laterales de aminoácidos que están presentes en la molécula que está completamente plegada (fig. 2-44).

Si la información que regula el plegamiento se localiza en la secuencia aminoacídica, entonces las alteraciones en esta secuencia tienen el potencial de cambiar el modo en que una proteína lleva a cabo el plegamiento, lo que crea una molécula con una estructura terciaria anormal. De esta forma, se han identificado muchas mutaciones causantes de alteraciones hereditarias que modifican la estructura tridimensional de una proteína. En algunos casos, las consecuencias del plegamiento deficiente de las proteínas pueden ser fatales. Dos ejemplos de enfermedades neurodegenerativas letales que se generan por plegamiento anormal de las proteínas se discuten en la sección Perspectiva humana.

Función de las chaperonas moleculares No todas las proteínas son capaces de asumir su estructura terciaria final por un simple proceso de autoensamblaje. Esto no se debe a que la estructura primaria de estas proteínas no posea la información requerida para el plegamiento adecuado, sino a que las proteínas que sufren plegamiento tienden a evitarse por las interacciones casuales con otras moléculas en los compartimientos celulares. Varias familias de proteínas han evolucionado con funciones que ayudan a las proteínas plegadas de manera errónea para que archiven sus conformaciones tridimensionales apropiadas. Estas "proteínas colaboradoras" se conocen como **chaperonas moleculares**; su especificidad consiste en que reconocen de modo selectivo y unen secuencias cortas de aminoácidos hidrófobos que tienden a exponerse en las proteínas no nativas, pero a ocultarse en proteínas que poseen una conformación nativa.



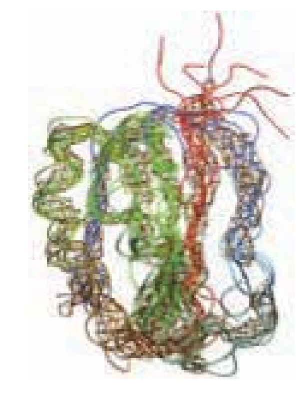


FIGURA 2-44 **Por la vía del plegamiento.** La imagen de la izquierda muestra la estructura terciaria nativa de la enzima acilfosfatasa. La imagen de la derecha es la estructura de transición que aparece muy rápidamente durante el plegamiento de esta enzima. La estructura de transición consta de numerosas líneas individuales porque es un conjunto de estructuras estrechamente relacionadas. La arquitectura general de la estructura de transición es similar a la de una proteína nativa, pero muchas de las características estructurales más finas de la proteína completamente plegada aún deben emerger. El paso del estado de transición a la proteína nativa implica el final de la formación de la estructura secundaria, un empaque más apretado de las cadenas laterales, y el final del enterramiento de las cadenas laterales hidrófobas desde el solvente acuoso. (Tomada de K. Lindorff-Larsen, et al., Trends Biochem. Sci. 30:14, 2005, cortesía de Christopher M. Dobson. Copyright 2005, con autorización de Elsevier Science.)

PERSPECTIVA HUMANA

El plegamiento de las proteínas puede tener consecuencias fatales

En abril de 1996 la revista médica *Lancet* publicó un artículo que generó una gran alarma en las poblaciones europeas. El artículo describió un estudio de 10 personas afectadas con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), una alteración rara y casi siempre letal que afecta el cerebro y ocasiona la pérdida de coordinación motora y demencia. Como otras anormalidades, la CJD puede presentarse como una enfermedad hereditaria que aparece en ciertas familias o como una forma esporádica en individuos que no tienen antecedente familiar de la afección. Sin embargo, a diferencia de otros trastornos hereditarios, la CJD puede también ser *adquirida*. En fecha reciente se detectó que las personas que adquirieron la CJD habían recibido órganos o partes orgánicas donadas por una persona con CJD no diagnosticada. Los casos descritos en el año de 1996 en el artículo de *Lancet* se debieron a causas adquiridas, pero al parecer la fuente de la enfermedad fue carne de res contaminada que los sujetos consumieron años atrás. La carne contaminada procedía de ganado de Inglaterra que había contraído una enfermedad neurodegenerativa; dicho padecimiento provocaba en los animales pérdida de la coordinación motora y comportamiento demente. La anomalía se conoció como la "enfermedad de las vacas locas". Los pacientes que habían adquirido CJD por comer carne contaminada de vacas podían distinguirse, con base en diferentes criterios, de aquellos que sufrieron las formas típicas de la enfermedad. Hasta la fecha, unas 170 personas han muerto por CJD adquirida de carne contaminada, y las cifras han venido declinando.[1]

Una enfermedad que afecta a familias enteras puede rastrearse casi siempre hasta un gen mutante; empero, las anormalidades adquiridas de una fuente contaminada pueden atribuirse de modo invariable a un agente infeccioso. ¿Cómo puede la misma enfermedad ser hereditaria e infecciosa? La respuesta a esta pregunta ha emergido de forma gradual en las décadas pasadas, primero con las observaciones de D. Carleton Gajdusek en la década de 1960 a partir de una rara enfermedad que afligió a la población nativa de Papúa, Nueva Guinea. Gajdusek mostró que estos isleños habían contraído una enfermedad letal neurodegenerativa que llamaban "kuru" durante los rituales funerales en los cuales comían el tejido cerebral del pariente fallecido. Las necropsias de los cerebros de los sujetos que habían muerto de kuru mostraron una anomalía diferente, conocida como *encefalopatía espongiforme*, en la cual ciertas regiones del cerebro estaban plagadas con pequeños orificios microscópicos (vacuolaciones), lo que daba al tejido un aspecto de esponja.

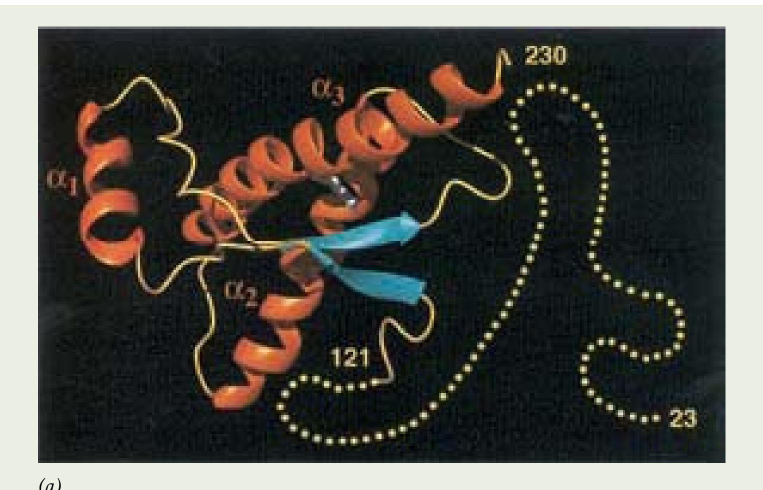
Se advirtió que los cerebros de los isleños que sufrían kuru eran muy similares en apariencia microscópica a los cerebros de personas afectadas con CJD. Esta observación suscitó una pregunta: ¿de qué manera los cerebros de los individuos que sufren CJD, una anormalidad hereditaria, contienen un agente infeccioso? En 1968, Gajdusek mostró que, cuando los preparados de una biopsia del cerebro de una persona perecida por CJD fueron inyectados en un animal de laboratorio, éste desarrollaba una encefalopatía espongiforme similar a la consecutiva a kuru o CJD. Con toda claridad, los extractos contenían un agente infeccioso, que en aquel tiempo se creyó era un virus.

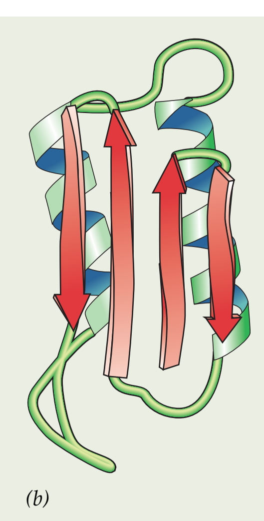
En 1982, Stanley Prusiner de la *University of California, San Francisco*, publicó un artículo que sugería que, en cambio con los virus, el agente etiológico de la CJD carecía de ácidos nucleicos y de hecho estaba compuesto tan sólo de proteínas. Prusiner concedió a la proteína el nombre de *prión*. Esta hipótesis de la "proteína única", como se la llamó, se recibió al principio con gran escepticismo, pero los estudios subsecuentes de Prusiner y otros arrojaron un gran número de evidencias que apoyaban la conclusión original. Primero se presupuso que la proteína prión era un agente externo, algún tipo de partícula semejante a los virus sin ácidos nucleicos. En oposición a esta suposición, la proteína prión mostró que un gen (*PRNP*) la codificaba dentro de los propios cromosomas de la célula. El gen se expresa dentro del tejido cerebral *normal* y codifica una proteína denominada PrP^C (una proteína prión celular) que reside en la superficie de las células nerviosas. La función precisa de la PrP^C se desconoce. Una versión modificada de la proteína (designada PrP^{Sc}, una proteína prión scrapie) se halla en los cerebros humanos con CJD. A diferencia de la PrP^C normal, la versión modificada de la proteína se acumula en las células nerviosas y forma agregados que destruyen a las neuronas.

En sus estados purificados, PrP^C y PrP^{Sc} muestran propiedades físicas muy diferentes. La PrP^C permanece como una molécula monomérica que es soluble en condiciones salinas y la destruyen enzimas que digieren proteínas. De manera contrastante, las moléculas de PrP^{Sc} interaccionan una con otra para formar moléculas fibrilares insolubles que son resistentes a la digestión enzimática. Con base en estas divergencias, debe esperarse que estas dos formas de proteínas PrP se compongan de distintas secuencias de aminoácidos, pero este no es el caso. Las dos variantes pueden alojar secuencias aminoacídicas idénticas, pero es diferente la manera en que se pliegan sus cadenas polipeptídicas para formar la molécula de proteína tridimensional (fig. 1). En tanto que una molécula de PrP^C consiste casi por entero en segmentos de hélice alfa y asas interconectadas, cerca de 45% de una molécula PrP^{Sc} tiene hojas beta. La PrP puede convertirse de una forma soluble en una insoluble que no es sensible a las proteasas y forma agregados in vitro, tan sólo con cambiar las condiciones en el tubo de ensayo.

No es difícil entender cómo un polipéptido mutante puede ser menos estable y plegarse de manera más común en una conformación anormal de PrP^{Sc}, pero ¿cómo es capaz de actuar esta proteína como un agente infeccioso? De acuerdo con la hipótesis difundida, la molécula de proteína prión anormal (PrP^{Sc}) puede unirse a una molécula normal (PrP^C) y actuar como un molde que permite que la proteína normal sufra el plegamiento anormal. Esta conversión puede mostrarse y ocurrir en un tubo de ensayo: la adición de PrP^{Sc} a una preparación de PrP^C puede al parecer convertir las moléculas de la PrP^C en la conformación PrP^{Sc}. Según esta hipótesis, la aparición de una proteína anormal en el cuerpo, ya sea como un resultado de un mal plegamiento, algo raro en el caso de una enfermedad esporádica, o por la exposición a instrumentos quirúrgicos contaminados, comienza con una reacción en cadena en la cual las moléculas de proteína normal en las células se transforman de modo gradual en la forma anormal de prión. Sigue siendo incierto el mecanismo preciso por el cual los priones causan la neurodegeneración.

[1] En la superficie, esto podría sugerir que la epidemia ha llegado a su fin, pero existen varias razones para que los encargados de la salud pública sigan preocupados. Y es que el estudio de los tejidos que se han extirpado durante las cirugías en Inglaterra indican que es probable que miles de personas estén infectadas de la enfermedad sin presentar síntomas. Incluso si estas personas nunca desarrollan la enfermedad clínica, siguen siendo portadores potenciales que podrían transmitir la CJD a otros mediante transfusiones sanguíneas. De hecho, se sospecha que cuando menos dos individuos contrajeron CJD después de recibir sangre de un donante enfermo. Estos datos subrayan la necesidad de probar la sangre en busca del agente causal (cuya naturaleza se expone enseguida).





(a) *(b)*

FIGURA 1 Comparación de las proteínas prión normales (PrP^{C}) y anormales (PrP^{Sc}). Estas dos proteínas [mostradas en *a*) y *b*) respectivamente] están formadas por cadenas polipeptídicas que pueden ser idénticas en la secuencia aminoacídica, pero su plegamiento es muy distinto. Como resultado de las diferencias en el proceso de plegamiento, la PrP^{C} es soluble y, por el contrario, la PrP^{Sc} genera agregados que matan a la célula. La línea punteada amarilla representa la porción N terminal del polipéptido, que carece de estructura definida. (Las dos moléculas que se muestran en esta figura se conocen como *conformeros* debido a que difieren en la conformación.) (*A*: Cortesía de Kürt Wüthrich; *B*: Tomada de S. B. Prusiner, Trends Biochem. Sci. 21:483, 1996. Copyright © 1996, con autorización de Elsevier Science.)

La ECJ es una rara afección causada por una proteína con propiedades infectivas únicas. La enfermedad de Alzheimer (AD), por otro lado, es un trastorno común que afecta a 10% de los individuos que tienen al menos 65 años de edad, y quizá a 40% de los sujetos con 80 años de edad o más. Las personas con EA sufren pérdida de la memoria, confusión y menor capacidad de raciocinio. La ECJ y la AD comparten un buen número de características relevantes. Las dos son enfermedades neurodegenerativas fatales que pueden ocurrir en forma hereditaria o esporádica. Como en el caso de la ECJ, el cerebro de una persona con enfermedad de Alzheimer contiene depósitos fibrilares de un material insoluble conocido como *amiloide* (fig. 2). En ambas anormalidades, los depósitos tóxicos fibrilares resultan de la autoasociación de un polipéptido compuesto de manera predominante de hojas beta. Existen también muchas diferencias básicas entre las dos anomalías: las proteínas que ocasionan la enfermedad son diferentes: utilizan agregados de proteínas no relacionadas, las partes del cerebro que están afectadas son distintas y la proteína causante de la AD no actúa como un agente infeccioso (es decir, *no es transmisible*).

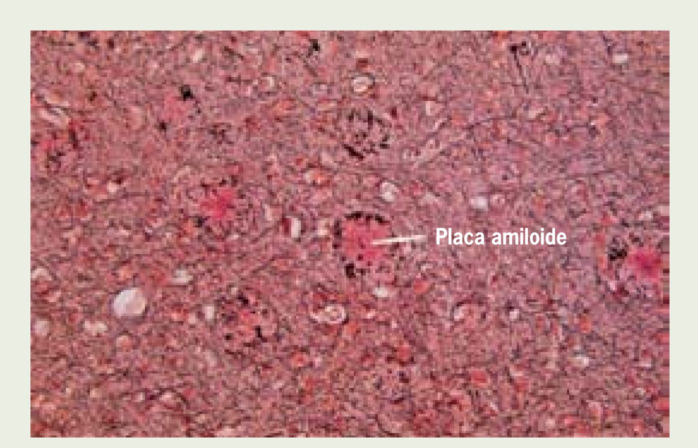


FIGURA 2 Apariencia microscópica del tejido cerebral de una persona que falleció por la enfermedad de Alzheimer. (Martin Rothker/Phototake.)

Casi toda la evidencia sugiere que la enfermedad de Alzheimer se debe a la producción de una molécula, llamada *péptido amiloide beta* (*Aβ*), que es parte de una larga proteína denominada *proteína precursora amiloide* (*APP*), la cual atraviesa la membrana de la célula nerviosa. El péptido Aβ se libera de la molécula de la APP después del corte por dos enzimas específicas, las secretasas beta y gamma (fig. 3). En consecuencia, la longitud del péptido Aβ es variable. Las especies predominantes tienen una longitud de 40 aminoácidos (llamados Aβ40), pero también se produce una menor especie con dos residuos hidrófobos (denominados Aβ42). Los dos péptidos pueden existir en una forma soluble que consiste de manera predominante en hélices alfa, si bien Aβ42 muestra una tendencia a plegarse de manera espontánea en conformaciones muy diferentes que contienen considerables hojas de plegamiento beta. La versión Aβ42 de la molécula es la que en potencia causa la enfermedad de Alzheimer, debido a que tiende a autoasociarse para crear pequeños complejos (oligómeros) y también grandes agregados que son visibles como fibrillas por medio de la microscopia electrónica. Aunque la controversia dista mucho de estar resuelta, pruebas recientes sugieren que los oligómeros solubles son los más tóxicos para las células nerviosas, más que los agregados insolubles. Al parecer dichos oligómeros atacan las sinapsis que conectan las células nerviosas entre sí y finalmente causan la muerte de estas células.

Las personas que padecen una forma hereditaria de AD portan una mutación que provoca aumento en la producción del péptido Aβ42. Tal sobreproducción puede ser causada por la posesión de copias extra (duplicaciones) del gen *APP*, por mutación en el gen *APP*, o por mutaciones en los genes (*PS1*, *PS2*) que codifican subunidades de secretasa γ. Los individuos con tales mutaciones presentan síntomas de la enfermedad a edades tempranas, por lo común hacia la sexta década de vida.

¿Qué sucedería si fuera posible prevenir la formación del amiloide beta o limpiar el cerebro una vez que éste se ha depositado?, ¿podría este tipo de terapia impedir que las personas desarrollaran la afección o posibilitar que éstas se sometieran a tratamiento incluso ya con signos de su presencia? Una de las mejores medidas para el desarrollo de terapéuticas de trastornos humanos consiste en encontrar modelos animales adecuados, en particular ratones, que desarrollen enfermedades similares y usarlos para probar la efectividad de las terapias potenciales. Los animales que exhiben una anomalía que semeja un padecimiento humano se conocen como *modelos animales*. Por alguna razón, los cere-

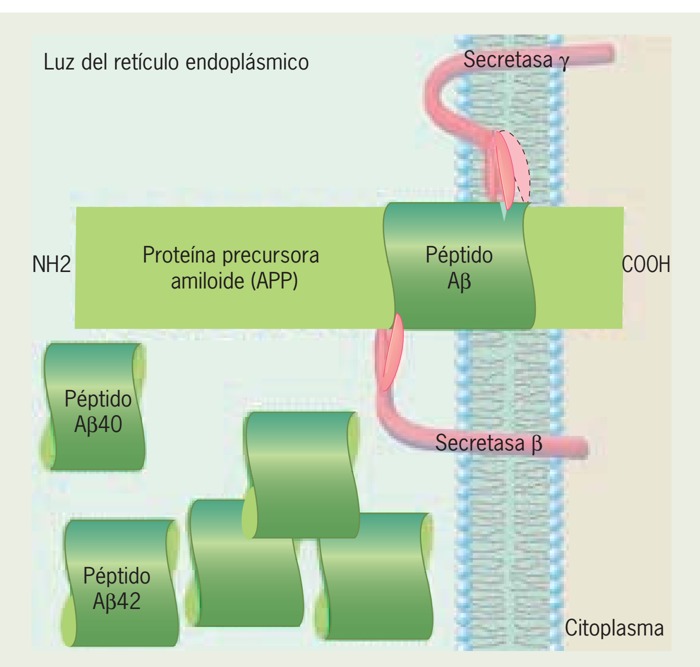


FIGURA 3 Formación del péptido Aβ. Éste se obtuvo por corte de la proteína precursora amiloide (APP) por medio de dos enzimas, secretasas beta y gamma. Resulta interesante que las dos enzimas y la APP poseen porciones transmembranosas. El corte de la APP ocurre dentro de la célula (es probable que tenga lugar en el retículo endoplásmico) y el producto resultante Aβ se secreta fuera de la célula. La secretasa gamma puede cortar dos sitios en la molécula APP y crear los péptidos Aβ40 o Aβ42, este último causante de la formación de las placas de amiloide que se observan en la figura 2. La secretasa gamma es una enzima formada por múltiples subunidades que corta este sustrato en un sitio que se encuentra inmerso en la membrana.

bros de ratones viejos no muestran evidencia de depósitos amiloides, como los que se identifican en personas y hasta el año de 1995 no existía ningún modelo animal para la enfermedad de Alzheimer. Entonces, en ese año, los investigadores se dieron cuenta que era necesario crear una cepa de ratón que desarrollara placas de amiloide en sus cerebros y que éstos estuvieran afectados en las tareas que utilizan la memoria. De esa manera crearon estas cepas de ratones por manipulación genética consistente en que llevan un gen humano mutante de *APP*, un causante de la enfermedad de Alzheimer en familias. Este ratón manipulado desde el punto de vista genético (*transgénico*) es invaluable para probar terapias potenciales para la AD.

En 1999, Dale Schenk y colaboradores de *Elan Pharmaceuticals* publicaron un hallazgo extraordinario. Estos investigadores habían descubierto que la formación de placas amiloides en ratones que portan el gen mutante humano *APP* podría bloquearse mediante inyecciones repetidas a los animales con la misma sustancia que causaba el problema, los agregados del péptido Aβ42. En efecto, los investigadores habían inmunizado (es decir, vacunado) a los ratones contra la enfermedad. Cuando los ratones jóvenes (seis semanas de edad) se inmunizaron con Aβ42, no pudieron desarrollar los depósitos de amiloide cerebrales cuando llegaron a la madurez. Cuando envejecieron (13 meses de edad) los ratones cuyos cerebros contenían grandes depósitos de amiloide se inmunizaron con el Aβ42 y una fracción significativa de los depósitos fibrilares se removió del sistema nervioso. De manera más importante, los ratones inmunizados se comportaron mucho mejor que los ratones no inmunizados en pruebas que incluían la memoria.

Este suceso espectacular de los experimentos en ratones, en combinación con el hecho de que los animales no mostraron efectos adversos por el procedimiento de inmunización, llevó a la legislación reguladora del gobierno a ensayar en poco tiempo una prueba clínica en fase I de la vacuna Aβ42. La prueba clínica en fase I en este primer paso incluye la prueba de un nuevo fármaco o procedimiento en seres humanos y casi siempre se realiza después de años de pruebas preclínicas en células en cultivo y modelos animales. Las pruebas de fase I se efectúan en un pequeño número de sujetos y se diseñan para vigilar la seguridad del procedimiento aparte de su efectividad contra la enfermedad.

Ninguno de los sujetos con la vacuna Aβ, en las dos pruebas de fase I separadas, mostró efectos adversos por la inyección del péptido amiloide. Como resultado, a los investigados se les permitió pasar a las pruebas clínicas de fase II, en las cuales interviene un grupo enorme de personas y se diseñan para obtener una medida de la efectividad del procedimiento (o fármacos). En esta prueba en fase II en particular se realizaron pruebas de tipo aleatorio y doble ciego, con estudio controlado con placebo. En este tipo de estudio:

1. Los pacientes se dividen de manera *aleatoria* en dos grupos que reciben tratamiento de manera similar, con la excepción que un grupo recibe el factor curativo (proteína, anticuerpos, fármacos, etc.) y se investigan y al otro grupo se le suministra un *placebo* (una sustancia inactiva que no tiene valor terapéutico).
2. El estudio es *doble ciego*, lo cual significa que ninguno de los investigadores o pacientes conoce quiénes reciben el tratamiento y cuáles el placebo.

Las pruebas en fase II para la vacuna Aβ incluyeron a más de 350 individuos de Estados Unidos y Europa con diagnóstico de AD de gravedad media a moderada. Después de recibir dos inyecciones del amiloide beta sintético (o un placebo), 6% de los sujetos experimentó una inflamación en el cerebro capaz de poner en riesgo la vida que pudo tratarse. La mayoría de estos pacientes se trató de modo satisfactorio con esteroides. Pese a que la prueba se suspendió debido a este efecto colateral peligroso, los pacientes que recibieron la vacuna en esta prueba aún se vigilan y existen razones para tener cierto optimismo. Las necropsias de varios sujetos del estudio que murieron como resultado de las complicaciones de la inflamación revelaron que las placas de amiloide de ciertas regiones de su cerebro habían desaparecido en grado notable. Estos informes sugieren que los anticuerpos producidos en respuesta a la inmunización habían entrado al cerebro e inducido los efectos deseados, justo como en los estudios originales en el ratón. De manera más relevante, las pruebas en 30 de los pacientes tomados del estudio suministraron una evidencia notoria de que la vacuna había tenido mejores efectos en la enfermedad de lenta progresión.

El objetivo actual es desarrollar estrategias de inmunización más seguras. El método más seguro, actualmente en fase clínica, es la inyección de antibióticos dirigidos contra Aβ producido fuera del cuerpo. Este tipo de plan se conoce como *inmunización pasiva* debido a que la persona no produce los anticuerpos terapéuticos por sí misma. Ya se ha probado que la inmunización pasiva es capaz de restaurar la función de memoria en ratones transgénicos. Si esta medida demuestra ser más segura y efectiva en las pruebas clínicas de fases I y II, entonces se pasará a la prueba en fase III, casi siempre el último paso antes de la aprobación por parte del gobierno. Una prueba de fase III emplea de manera característica a gran número de sujetos (mil o más en diferentes centros de investigación) y compara la efectividad del nuevo tratamiento con los tratamientos estándar.

Se han propuesto dos estrategias terapéuticas para la *prevención* de la AD, las cuales son resultado de estudios epidemiológicos en los que se intenta correlacionar el desenlace de una enfermedad en particular con una actividad específica en miembros de una gran población. Diferentes estudios epidemiológicos informan que los individuos que han tomado a) ciertos fármacos antiinflamatorios, como ibuprofeno, o b) medicamentos que reducen el colesterol llamados estatinas, tienen

una incidencia notablemente reducida de enfermedad de Alzheimer. Ambos tipos de fármacos ya se han aprobado para uso humano y los han consumido decenas de millones de personas con regularidad, lo cual los hace agentes terapéuticos ideales. Están en marcha ensayos controlados a gran escala para medir específicamente su capacidad de prevenir la AD. Los estudios epidemiológicos también sugieren que el inicio de la AD se retrasa en personas que siguen participando en actividades físicas o que desafían la inteligencia.

También se consideran otros enfoques para el tratamiento de la AD. Entre ellos se incluyen *a*) implante cerebral de células que secretan NGF, una proteína con probada capacidad de prevenir la neurodegeneración en modelos animales, *b*) compuestos que inhiben la actividad enzimática de las secretasas β o γ, los cuales podrían atenuar la producción de Aβ42, *c*) compuestos que se unen al péptido Aβ soluble e impiden que se agreguen o formen fibrillas [uno de tales compuestos (Alzhemed) es muy promisorio para retardar o prevenir la declinación cognitiva en pacientes con AD leve], *d*) compuestos que inhiben la ACAT, una enzima implicada en el metabolismo del colesterol y cuya actividad podría incrementar la producción de Aβ, *e*) estimulación de enzimas que promueven la degradación de Aβ y *f*) compuestos como el clioquinol, que eliminan (quelan) cinc e iones de cobre. En condiciones normales, estos dos iones están presentes dentro de las placas de amiloide y se piensa que promueven la formación de la placa. Dada la amplia variedad de terapias potenciales que se ensayan, existe alguna razón para tener optimismo de que la enfermedad de Alzheimer pronto será tratable. (Los resultados de los estudios sobre estos y otros tratamientos pueden consultarse en www.alzforum.org/dis/tre/drc)

La figura 2-45 muestra las actividades de varias clases de chaperonas moleculares que operan en el citosol de las células eucariotas. Las cadenas polipeptídicas se sintetizan en los ribosomas por la adición de aminoácidos, uno en cada vez, comenzando por la cadena N terminal (paso 1, fig. 2-45). Las chaperonas de la familia Hsp70 se unen para alargar las cadenas polipeptídicas que emergen del canal de salida dentro de la subunidad mayor del ribosoma (paso 2). Las chaperonas de la familia Hsp70 impiden al parecer que estos polipéptidos parcialmente formados (p. ej., polipéptidos *nacientes*) formen interacciones inapropiadas que podrían dar lugar a una unión con otras proteínas en el citosol o un plegamiento incorrecto. Una vez que se completa su síntesis (paso 3), la chaperona libera a muchas de estas proteínas en el citosol, donde se pliegan de manera espontánea en su estado nativo (paso 4). Muchos de los grandes polipéptidos se transfieren de las proteínas Hsp70 a diferentes tipos de chaperonas conocidas como *chaperoninas* (paso 5). Éstas son complejos de proteínas cilíndricas que contienen una cavidad central en la cual los polipéptidos nuevos sintetizados se pueden plegar sin la interferencia de otras macromoléculas en las células. TRiC es una chaperonina que se cree participa en el plegamiento de más de 15% de los polipéptidos sintetizados en las células de los mamíferos. El descubrimiento y mecanismo de acción de las Hsp70 y las chaperoninas se analizan con detalle en la sección Vías experimentales en la página 78.

El nacimiento del campo de la proteómica Con toda la atención concedida a las secuenciaciones del genoma en años recientes, es fácil perder de vista el hecho de que los genes son las unidades de almacenamiento de la información primaria, si bien las proteínas controlan actividades celulares de importancia. La secuenciación del genoma proporciona una especie de "catálogo de partes". El genoma humano se integra de unos 25 000 genes, cada uno de los cuales puede suministrar en potencia una diversidad de proteínas diferentes.[6] En la actualidad, sólo se ha caracterizado una fracción de estas moléculas.

El inventario completo de proteínas que produce un organismo como el humano se conoce como **proteoma**. El término también se aplica al inventario entero de las proteínas presentes en un tejido en particular, célula u organelo celular. Debido al incremento del número de proteínas que están bajo estudio, los investigadores han sugerido el desarrollo de técnicas que permitan determinar las propiedades o actividades de un gran número de proteínas en un solo experimento. Se acuñó un término nuevo (**proteómica**) para describir el creciente campo de la bioquímica de proteínas. Este término incluye el concepto de tecnologías avanzadas y computadoras que se han usado para realizar estudios a gran escala para diversos ordenamientos de proteínas. Esta es la misma medida básica que probó su utilidad en la década pasada en los genomas. Empero, el estudio de la proteómica es inherentemente más difícil que el estudio de la genómica debido a que las proteínas son más difíciles de trabajar en comparación con el DNA. En términos físicos, un gen es con mucho el mismo en todos los otros organismos, pero cada proteína tiene propiedades químicas únicas y requerimientos para su manipulación diferentes. Además, pequeñas cantidades de un segmento de DNA específico pueden expandirse en gran medida por medio de enzimas fáciles de conseguir, mientras que no es posible incrementar las cantidades de proteína. Esto es especialmente problemático cuando se considera que en el caso de muchas de las proteínas que regulan los procesos celulares importantes sólo hay un puñado de copias por célula.

Por tradición, los bioquímicos de las proteínas han tratado de contestar varias preguntas relacionadas con proteínas en particular. Entre ellas se incluyen: ¿qué actividades específicas realiza la proteína in vitro y cómo ayuda esta actividad a llevar a cabo en una célula una función en particular, como la locomoción celular o la replicación del DNA?, ¿cuál es la estructura tridimensional de la proteína?, ¿cuándo aparece la proteína en el desarrollo del organismo y en qué tipos celulares?, ¿dónde

[6] Existen diferentes vías por las cuales un gen puede generar más de un polipéptido. Dos de los mecanismos más importantes son el procesamiento alternativo y las modificaciones postraduccionales que se analizan en otras secciones del texto. También puede observarse que muchas proteínas tienen más de una función. Incluso se demostró en fecha reciente que la mioglobina, que desde hace mucho tiempo se estudia como una proteína de almacenamiento de oxígeno, interviene en la conversión de óxido nítrico (NO) a nitrato (NO_3^-).

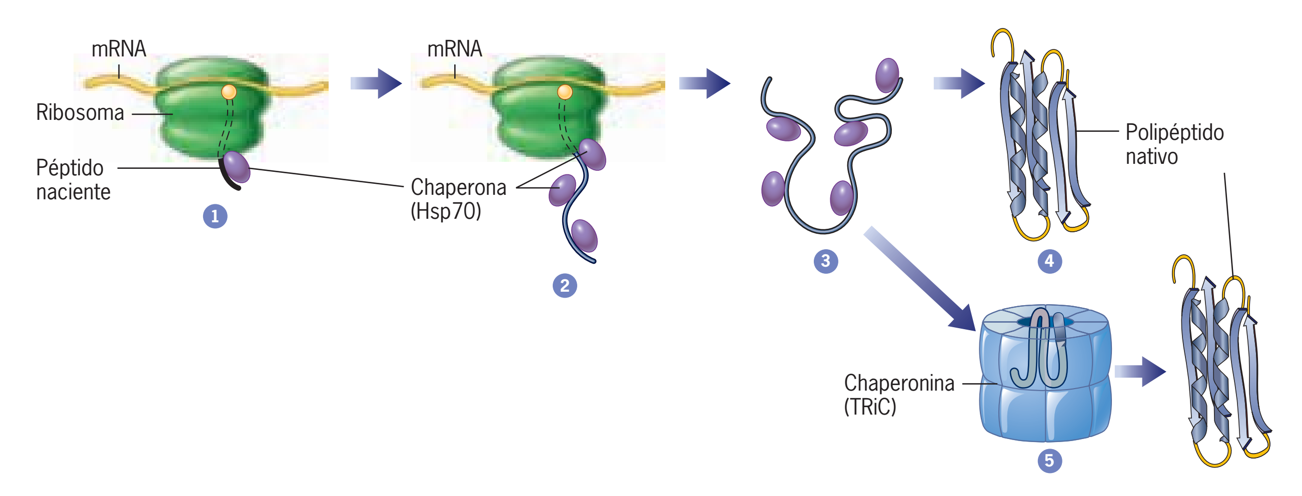


FIGURA 2-45 La función de las chaperonas moleculares en la estimulación del plegamiento proteico. Los pasos se describen en el texto. (Se conocen otras familias de chaperonas, pero no se exponen aquí.)

se localiza en la célula?, ¿se modifica la proteína después de su síntesis por la adición de grupos químicos (p. ej., fosfatos o azúcares) y, si es así, cómo modifica ésta su actividad?, ¿qué proporción de la proteína está presente y cuánto logra sobrevivir antes de degradarse?, ¿hay cambios en el nivel de la proteína durante las actividades fisiológicas o como resultado de alguna enfermedad?, ¿otras proteínas de la célula interactúan con esta proteína? Por décadas los biólogos han tratado de contestar estas preguntas, pero la mayoría ha tratado de hacerlo a partir de una proteína a la vez. Los investigadores en proteómica intentan contestar preguntas similares a una escala mucho más comprensiva con técnicas automatizadas (fig. 2-46). Observe cómo las aproximaciones sistemáticas pueden emplearse para investigar las interacciones entre proteína y proteína (pág. 62). La atención puede centrarse también en la tarea al parecer impresionante de

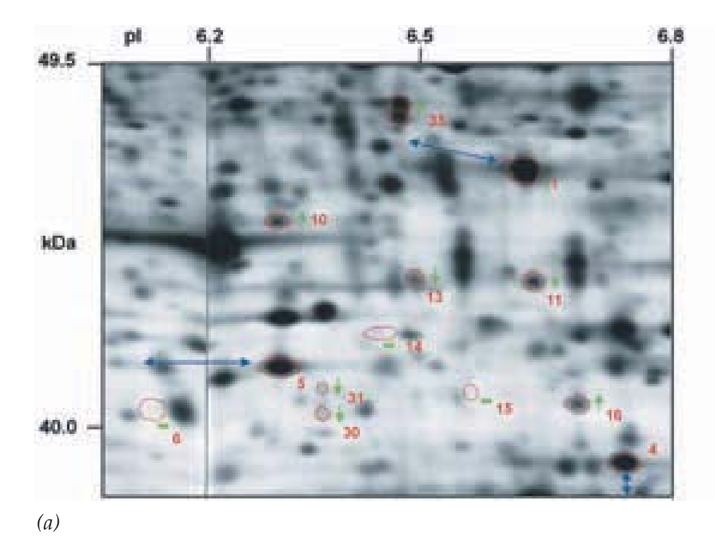
FIGURA 2-46 (IMAGEN DE ART © JOE SUTLIFF.)

identificar el ordenamiento tan vasto de las proteínas producidas por una célula en particular.

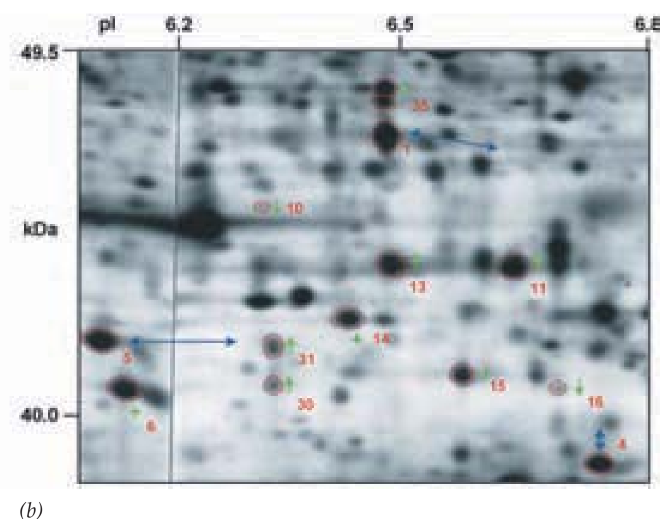
La figura 2-47 muestra porciones de dos geles que se usaron para fraccionar (separar) una mezcla de proteínas extraídas de la misma parte de los cerebros humanos (fig. 2-47*a*) y del chimpancé (fig. 2-47*b*). Las proteínas se fraccionaron mediante un procedimiento conocido como electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (descrito con detalle en la sección 18.7).

Los geles contenían cientos de diferentes manchas teñidas, cada una de las cuales comprendía una sola proteína, o por lo menos algunas proteínas que poseen propiedades físicas similares y son por tanto difíciles de separar unas de otras. Esta técnica, que se desarrolló a mediados de la década de 1970, fue la primera y permitió separar de mejor forma un gran número de proteínas en una mezcla. Es evidente que virtualmente todas las manchas en un gel tienen su contraparte en el otro gel; estas manchas presentes en ambos geles corresponden a las proteínas homólogas que se comparten en las dos especies. Ciertas manchas están marcadas con números rojos. Las manchas numeradas corresponden a proteínas que muestran diferencias en los dos geles, ya sea debido a que: a) las proteínas tienen migraciones en posición apenas distintas (como resultado de una diferencia en la secuencia aminoacídica en la proteína entre los dos organismos) (indicado por las flechas de doble cabeza) o b) las proteínas están presentes en cantidades notablemente diferentes en los cerebros de los dos organismos (indicado por las flechas verdes). En todo caso, este tipo de experimento de proteómica suministra un vistazo de las diferencias en la expresión de proteínas en el cerebro humano en comparación con otro organismo viviente relativamente cercano.

Una cosa es separar proteínas y otra muy diferente identificar cada una de las moléculas separadas. En los años recientes, dos tecnologías se han desarrollado, espectrometría de masas y computación de alta velocidad, y han hecho posible identificar cualquiera o todas las proteínas presentes en un gel, como las que se muestran en la figura 2-47. Como se describe de modo



(a)



(b)

FIGURA 2-47 Por lo general, el estudio de la proteómica requiere la separación de mezclas complejas de proteínas. Aquí se muestra la electroforesis en dos geles que contienen proteínas obtenidas de la corteza frontal de los cerebros humanos *a*) o del chimpancé *b*). Las manchas numeradas representan proteínas homólogas que muestran diferencias distintivas en los dos geles como se discute en el texto. (*Nota:* ésta es sólo una pequeña fracción de un gel mucho más grande que contiene alrededor de 8 500 manchas que simbolizan proteínas sintetizadas en el cerebro del primate.) (*Nota:* los animales utilizados para este estudio fallecieron por causas naturales.) (TOMADA DE W. ENARD, ET AL., SCIENCE 296:342, 2002, CORTESÍA DE SVANTE PÄÄBO. COPYRIGHT © 2002 AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE.)

más detallado en la sección 18.7, la espectrometría de masa es una técnica que determina la masa precisa de una molécula o fragmento de una molécula que se puede utilizar para identificar estas moléculas. Supóngase que se desea identificar la proteína presente en la mancha que está indicada con el número 1 en rojo. La proteína que forma la mancha puede removerse del gel y digerirse con la enzima tripsina, la cual corta el polipéptido en pequeños péptidos que tienen residuos de lisina o arginina en su extremo terminal carboxilo. Cuando estos péptidos se introducen en un espectrómetro de masas se convierten en iones gaseosos y se separan de acuerdo con su masa/carga (m/z). Los resultados aparecen como una serie de picos que muestran la relación m/z, como se observa en la figura 2-48. El patrón de picos constituye una característica importante de esta proteína, *las huellas digitales de la masa del péptido*. Sin embargo, ¿cómo puede una proteína identificarse con base en la huella que forman el péptido y su masa?

La generación de huellas de masa de péptidos es uno de los elementos de la nueva tecnología proteómica; otra se basa en los avances de la tecnología de computación. Una vez que se ha potenciado el genoma, la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas puede predecirse. La lista de "proteínas

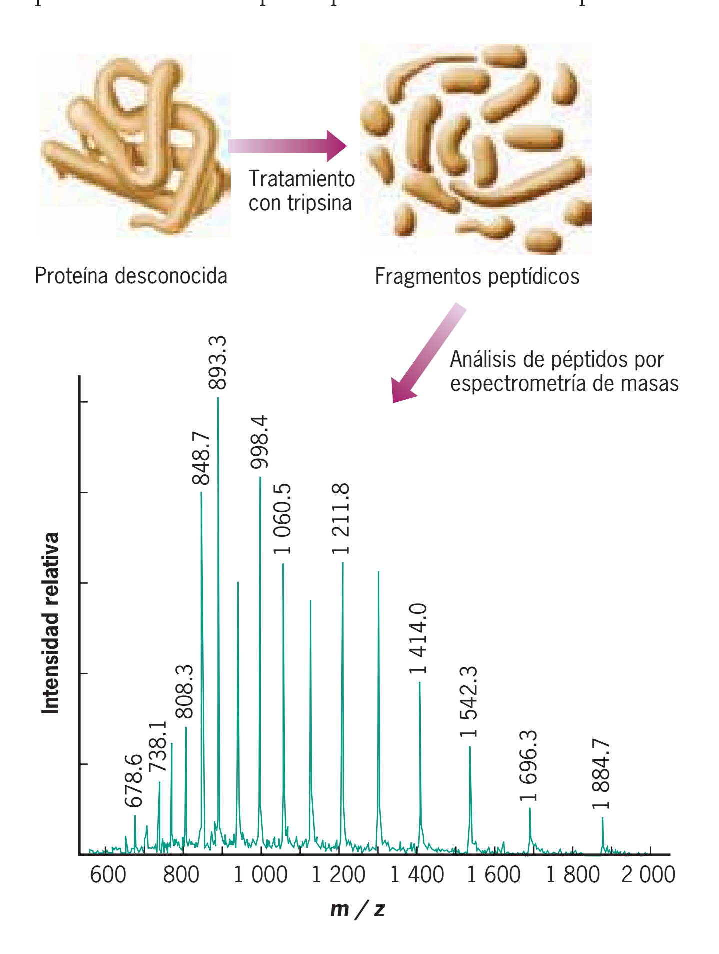


FIGURA 2-48 Identificación de proteínas por medio de espectrometría de masas. Una proteína se aísla de un tejido (como una de las manchas del gel de la figura 2-47) y se somete a digestión con tripsina. Los fragmentos peptídicos se ionizan y separan de acuerdo con su relación masa/carga (m/z) por medio de espectrometría de masas. Los péptidos separados aparecen como un patrón de picos que indican su relación m/z. Una comparación de esta relación con las de un banco de datos de la digestión teórica de proteínas codificadas por el genoma permite a los investigadores identificar la proteína bajo estudio. En este caso, el espectro MS se aplicó a la mioglobina de caballo sin el grupo hemo. (DATOS REIMPRESOS DE J. R. YATES, METHODS ENZYMOL 27:353, 1996. COPYRIGHT © 1996, CON AUTORIZACIÓN DE ELSEVIER.)

virtuales" puede someterse en teoría a una digestión con tripsina y las masas de los péptidos virtuales restantes se pueden calcular; esta información se almacena en un banco de datos. Luego de lo anterior, el péptido de masa actual de una proteína purificada obtenida por espectrometría de masas puede compararse mediante el uso de supercomputadoras para las masas que pueden producirse por digestiones teóricas de todos los péptidos codificados por el genoma. En la mayoría de los casos, la proteína aislada y sujeta a espectrometría de masas puede identificarse de manera directa en un banco de datos. La proteína marcada con el número 1 en los geles de la figura 2-47, por ejemplo, parece ser la enzima reductasa de aldosa. Los espectrómetros de masas no se limitan a manipular una proteína purificada en una sola vez; también son capaces de analizar las proteínas presentes en mezclas complejas (sección 18.7). La espectrometría de masas es especialmente útil para dilucidar cómo cambia con el tiempo el complemento de proteínas de una célula o un tejido, como podría ocurrir por ejemplo después de la secreción de una hormona dentro del cuerpo, o luego de tomar un fármaco, o durante una enfermedad específica. A continuación se describe en forma breve cómo esta tecnología puede utilizarse en los avances y la práctica de la medicina.

En 2002, un equipo del *National Cancer Institute* publicó un estudio en el que se usó espectrometría de masas para comparar las proteínas presentes en la sangre de pacientes con cáncer ovárico y de voluntarias sanas. Se encontró que los dos grupos podían distinguirse. El proteoma sérico de las mujeres con cáncer ovárico mostraba un patrón bien definido de picos que representaban numerosas proteínas de identidad desconocida. Con base en estas observaciones se ha desarrollado una prueba no invasora llamada OvaCheck, capaz de detectar este cáncer letal en una fase temprana. Tal prueba de detección tendría consecuencias de largo alcance, porque el cáncer ovárico rara vez se detecta cuando todavía es curable. Cuando se desarrollaba esta prueba diagnóstica para cáncer ovárico, varios investigadores especializados en proteómica analizaron de manera independiente los resultados originales presentados en las publicaciones y en Internet. Concluyeron que los datos habían sido mal interpretados, y no hallaron diferencias significativas en los perfiles espectrales de masa informados entre el suero de mujeres sanas y las que sufrían cáncer ovárico (u otros tipos de cáncer en otros estudios). Resultó evidente que este tema sólo se resolverá cuando la validez de OvaCheck y otras pruebas diagnósticas basadas en la proteómica se analice en ambientes clínicos a gran escala.

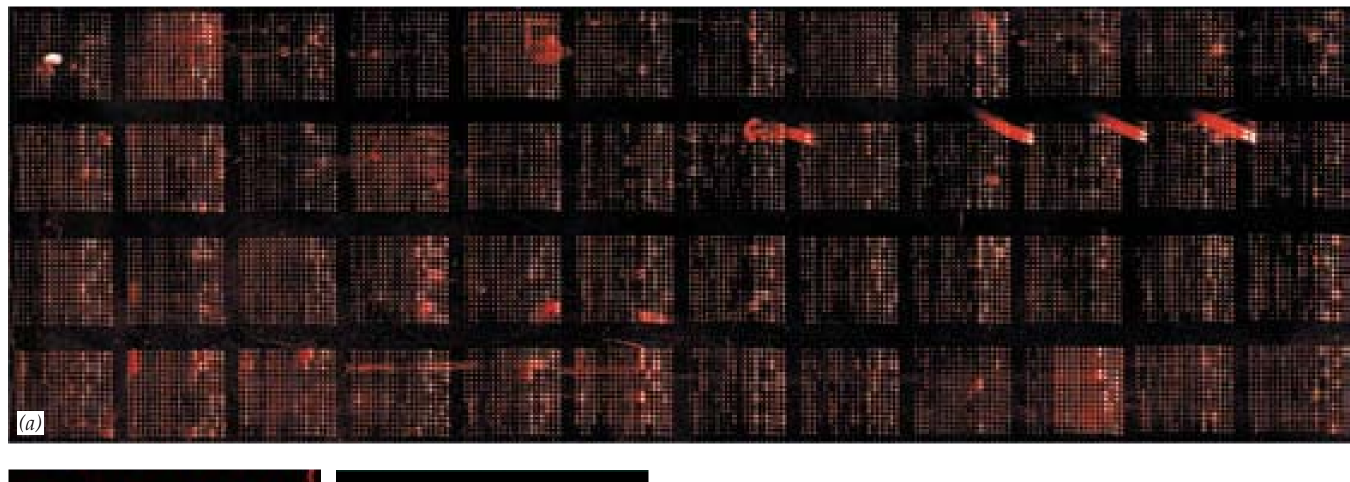
A pesar de esta controversia, muchos investigadores clínicos consideran que la mayoría de las enfermedades humanas dejan patrones reveladores (o *biomarcadores*) entre los cientos de proteínas presentes en el suero humano. Se organizó un esfuerzo internacional llamado Proyecto Proteoma Humano para estudiar los patrones de proteínas en muestras de suero obtenidas de pacientes con una multitud de trastornos. Un día será posible que un solo análisis de sangre revele la existencia de enfermedades tempranas del corazón, hígado o riñón y se las trate antes de convertirse en anormalidades capaces de poner en riesgo la vida.

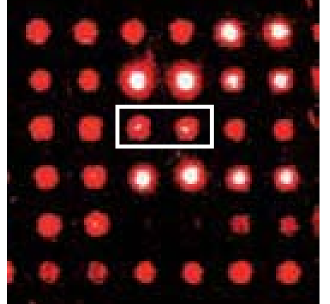
La práctica de la medicina se ha beneficiado más de los estudios de la proteómica que las mejores pruebas de escrutinio. Estas proteínas están presentes en los tejidos afectados y ausentes de sus contrapartes intactas. Tras identificar estas proteínas es posible precisar el papel que tienen en el desarrollo de la enfermedad. Se ha determinado que una proteína en particular desempeña una función principal en el origen de la enfermedad, como la proteína ABL que provoca ciertas leucemias (sección 16.4); en consecuencia, es posible desarrollar fármacos dirigidos a proteínas específicas (pág. 73). Los medicamentos disponibles en el mercado tienen como blanco unas 500 proteínas diferentes, pero este número podría crecer de modo sustancial en el futuro cercano como resultado de la tecnología de la proteómica.

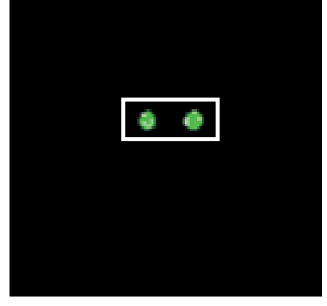
Las técnicas de separación de proteínas y la espectrometría de masas dicen poco de la función proteica. Los investigadores de instituciones académicas y compañías biotecnológicas han trabajado para mejorar y desarrollar técnicas que permitan determinar la función de las proteínas a gran escala, no sólo una proteína a la vez. Nuevas tecnologías se han ideado para llevar a cabo esta misión; aquí sólo se considera una: el *microordenamiento de proteínas* (o *chips de proteínas*). Esta herramienta utiliza un soporte sólido, casi siempre un cubreobjetos de vidrio cubierto con manchas o gotas microscópicas, cada gota con una muestra de proteína individual. Los microordenamientos de proteínas se elaboran para la aplicación de pequeños volúmenes de proteínas individuales en sitios específicos en el cubreobjetos, lo cual crea una disposición de proteínas como la que se muestra en la figura 2-49*a*. Las 6 000 proteínas de levadura o más codificadas por su genoma pueden acomodarse muy bien como puntos individuales en un cubreobjetos de vidrio usado en microscopia.

Una vez que se ha creado un microordenamiento y las proteínas que éste contiene pueden estudiarse para precisar varios tipos de actividades. Considérese el papel de los iones de calcio por un momento. Éstos juegan un papel central en muchas actividades, por ejemplo, la formación de impulsos nerviosos, la liberación de hormonas en la sangre y la contracción muscular. En cada uno de estos casos, los iones de calcio actúan para acoplarse a proteínas que unen calcio. Como se discute en el capítulo 15, la calmodulina es una importante proteína que une calcio y también se encuentra en la levadura. La figura 2-49*b* muestra una pequeña porción de un microordenamiento de proteínas de levadura que se ha incubado con la proteína calmodulina en la presencia de iones de calcio. Estas proteínas en el arreglo emiten fluorescencia verde, son algunas que se han unido a la calmodulina durante la incubación y de esta forma se reconoce que intervienen en la actividad de señalización por calcio. En este experimento específico de búsqueda de proteínas se descubrieron 33 nuevas proteínas que se unen a la calmodulina. Estos tipos de estudios abren la puerta al análisis de grandes cantidades de proteínas con función desconocida.

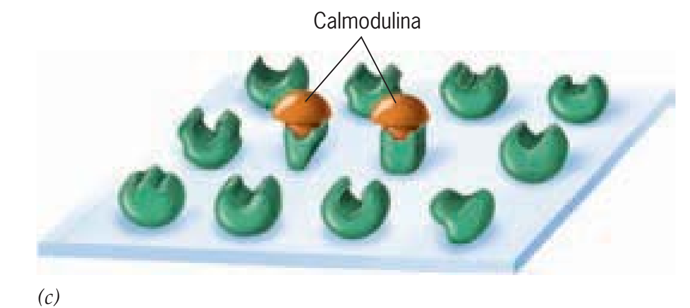
Se espera también que los chips de proteínas se empleen algún día en los laboratorios clínicos para reconocer a aquellas características de enfermedades particulares. Estas proteínas deben identificarse de manera inicial por espectrometría de masas, como se mencionó antes en relación con el cáncer ovárico. La vía más simple para determinar si una característica específica de una proteína en una anormalidad está presente en una muestra de sangre u orina, y en qué proporción, consiste en medir la interacción de la proteína con un anticuerpo específico. Esta es la base, por ejemplo, de la prueba denominada PSA (antígeno prostático específico) en la búsqueda de rutina del cáncer de próstata en el hombre. El PSA es una proteína que se encuentra en la sangre de los hombres normales, pero se







(b)



(c)

FIGURA 2-49 Análisis global de la función proteica mediante chips de proteínas. *a*) El portaobjetos empleado contiene 5 800 gotas que corresponden a duplicados de proteínas de levadura. Las proteínas goteadas en el portaobjetos se sintetizaron en células modificadas por ingeniería genética. Las manchas emiten fluorescencia roja debido a que se incubaron con un anticuerpo marcado con fluorescencia que se puede unir a todas las proteínas en el ordenamiento. *b*) La imagen de la izquierda muestra una pequeña porción de la configuración de proteínas que se muestra en *a*. La imagen de la derecha ilustra la misma porción del ordenamiento posterior a la incubación con calmodulina en la presencia de iones calcio. Las dos proteínas que evidencian fluorescencia verde son proteínas que unen calmodulina. *c*) Ilustración esquemática de los sucesos que ocurren en *b* cuando la calmodulina se une a dos proteínas del microordenamiento que tienen sitios de unión complementarios. (*A* y *B*, tomadas de H. Zhu, et al., Science 293:2101, 2001, cortesía de Michael Snyder. Copyright © 2001 American Association for the Advancement of Science.)

halla en niveles elevados en individuos con cáncer de próstata. Los niveles de PSA se estiman al evaluar la cantidad de proteína en la sangre que se une a anticuerpos contra PSA. Se espera en el futuro cercano que las compañías biotecnológicas desarrollen microordenamientos que contengan anticuerpos capaces de unir un gran número de diferentes proteínas de la sangre. La presencia o la cantidad, o ambas cosas, de estas proteínas deben indicar que una persona puede estar afectada de una u otra de la amplia variedad de afecciones.

Ingeniería proteínica Los avances de la biología molecular han creado la oportunidad de diseñar y producir en masa nuevas proteínas que son diferentes respecto de las elaboradas por los organismos vivos. Es posible con las técnicas actuales que sintetizan DNA crear genes artificiales utilizables en la producción de una proteína que tenga una secuencia deseada de aminoácidos. También es posible sintetizar polipéptidos "de la nada" por medio de técnicas químicas. Esta última estrategia permite a los investigadores incorporar bloques de construcción distintos de los 20 aminoácidos normalmente presentes en la naturaleza.

El problema con estos tipos de esfuerzos de ingeniería radica en conocer cuál de la infinita variedad de posibles proteínas podría elaborarse y tener una función útil. Considere, por ejemplo, una compañía farmacéutica que espera crear una proteína que pueda unirse a la superficie del virus del sida y eliminar a éste de una solución acuosa, por ejemplo, el flujo sanguíneo. Asúmase que la simulación con un programa computacional predijera la forma que tal proteína debe tener para unirse a la superficie viral. ¿Qué secuencia de aminoácidos se debe reunir para producir dicha proteína? La respuesta requiere un conocimiento detallado de las reglas que gobiernan la relación entre estructuras primaria y terciaria de una proteína.

En años recientes se lograron grandes avances en la síntesis de genes artificiales cuyos productos peptídicos pueden plegarse en estructuras secundarias relativamente simples, como fragmentos de hélice alfa o dos a tres láminas beta plegadas. Sin embargo, los intentos para crear una estructura más compleja de polipéptidos a partir de la inicial son mucho más difíciles. Los investigadores han encontrado, por ejemplo, que es más difícil predecir la forma que una secuencia particular adoptará en el

contexto de una proteína entera. Una extensión similar de aminoácidos puede crear diferentes tipos de estructuras secundarias en diferentes proteínas, según sean las influencias externas de otras regiones de la molécula. Estas dificultades sirven como recordatorio del alto nivel de complejidad de las proteínas y la limitada comprensión de la manera como la naturaleza transforma un mensaje genético lineal en una proteína funcional tridimensional.

Un método alternativo para la producción de nuevas proteínas consiste en modificar las elaboradas por las células. Avances recientes en la tecnología del DNA han permitido a los investigadores aislar un gen individual de los cromosomas humanos, alterar su contenido de información en forma precisa y luego sintetizar la proteína modificada con la secuencia de aminoácidos alterada. Esta técnica, que se conoce como **mutagénesis dirigida al sitio** (sección 18.18), tiene gran variedad de usos, tanto en investigación básica como en biología aplicada. Por ejemplo, si un investigador desea determinar el papel de un residuo en particular en el plegamiento o función de un polipéptido, se puede mutar el gen que sustituye a un aminoácido con diferente carga, carácter hidrófobo o propiedades para formar puentes de hidrógeno. De ese modo puede determinarse el efecto de la sustitución en la estructura y función de la proteína modificada. Como se observa a través de este libro, la mutagénesis dirigida es una herramienta invaluable en el análisis de funciones específicas de partes pequeñas de virtualmente todas las proteínas de interés para los biólogos.

La mutagénesis dirigida también se emplea para modificar la estructura de proteínas de utilidad clínica para inducir diversos efectos fisiológicos. Por ejemplo, el fármaco pegvisomant, aprobado por la FDA en 2003, es una versión modificada de la hormona del crecimiento (GH) humana que contiene varias modificaciones. La GH normalmente actúa uniéndose a un receptor en la superficie de las células blanco, lo cual induce una respuesta fisiológica. El pegvisomant compite con la GH para unirse al receptor de GH, pero la interacción entre fármaco y receptor no desencadena la respuesta celular. El pegvisomant se prescribe para el tratamiento de la acromegalia, el cual es un trastorno que resulta de la producción excesiva de hormona del crecimiento.

Diseño de fármacos basado en la estructura La producción de nuevas proteínas es una de las aplicaciones clínicas resultado de los recientes descubrimientos en la biología molecular; otra es el desarrollo de nuevos fármacos que actúan por medio de la unión a proteínas al suprimir su actividad. Las compañías farmacéuticas tienen acceso a "bibliotecas" químicas que contienen cientos de miles de diferentes compuestos orgánicos aislados de plantas, microorganismos o sintetizados de forma química. Una medida para buscar o analizar el potencial de los medicamentos consiste en exponer la proteína en cuestión a combinaciones de sus compuestos y determinar qué compuestos, si existen, son capaces de unirse con alta afinidad. Una forma alternativa, que puede emplearse si se conoce la estructura terciaria de una proteína, es el uso de computadoras para diseñar "de manera virtual" moléculas de medicamentos cuyo tamaño y forma hacen posible a éstos introducirse en las cavidades aparentes de la proteína e inactivarla.

Es posible ilustrar ambas tecnologías considerando el desarrollo del fármaco imatinib, como se ilustra en la figura 2-50*a*. La introducción del imatinib en la clínica ha revolucionado el tratamiento de varios cánceres relativamente raros, más notablemente el de la leucemia mielógena crónica (*chronic myelogenous leukemia*, CML). Como se expone en detalle en los capítulos 15 y 16, un grupo de enzimas llamadas tirosincinasas (o cinasas de tirosina) a menudo interviene en la transformación de células normales en cancerosas. Las tirosincinasas catalizan una reacción en la cual un grupo fosfato se agrega a residuos tirosina específicos dentro de una proteína blanco, un suceso que puede activar o desactivar esta última. El desarrollo de la CML es impulsado casi unilateralmente por la presencia de una tirosincinasa sobreactiva llamada ABL.

Durante la década de 1980 los investigadores identificaron un compuesto denominado 2-fenilaminopirimidina, capaz de inhibir tirosincinasas. Este compuesto se descubrió durante la búsqueda al azar de compuestos con esta actividad específica en una gran biblioteca química (fig. 2-50*a*). Como suele ocurrir en estos tipos de experimentos de búsqueda a ciegas, la 2-fenilaminopirimidina no habría sido un fármaco muy eficaz. Una razón es que sólo es un inhibidor enzimático débil, lo cual significa que habría tenido que usarse en dosis muy grandes. La 2-fenilaminopirimidina se describe como un compuesto *punta*, a partir del cual podrían desarrollarse fármacos útiles. Comenzando con esta molécula punta, se sintetizaron compuestos de mayor potencia y especificidad mediante el diseño de fármacos basado en la estructura. Uno de los compuestos que emergieron de este proceso fue el imatinib (fig. 2-50*b*), el cual se descubrió que se une fuertemente a la forma inactiva de la tirosincinasa ABL e impide la activación de la enzima, un paso necesario para que la célula se torne cancerosa. En la figura 2-50*c* se muestra la naturaleza complementaria de la interacción entre el fármaco y su enzima blanco. En estudios preclínicos en el laboratorio se demostró que el imatinib inhibe fuertemente la proliferación de las células de los pacientes con CML, y en pruebas con animales se vio que el compuesto no tiene efectos dañinos. En el primer ensayo clínico del imatinib, los 31 pacientes con CML entraron en remisión después de tomar el compuesto en dosis una vez al día.

Adaptación de las proteínas y evolución Las adaptaciones son características que mejoran la probabilidad de sobrevivencia de un organismo en un ambiente particular. Las proteínas son adaptaciones bioquímicas que están sujetas a selección natural y cambios evolutivos en la misma vía, como en otros tipos de características, como los ojos o el esqueleto. Esto es más evidente cuando se compara la homología de proteínas en organismos vivientes bajo muy diferentes condiciones ambientales. Por ejemplo, las proteínas halofílicas (que prefieren la sal) de la arqueobacteria poseen sustituciones aminoacídicas que permiten a ésta mantener su solubilidad y función en concentraciones de sal muy altas en el citosol (superior a 4 M de cloruro de potasio). A diferencia de sus contrapartes en otros organismos, la superficie de la versión halófila de las proteínas de la deshidrogenasa de malato, por ejemplo, se cubre con residuos de ácidos aspártico y glutámico, cuyos grupos carboxilo pueden competir con la sal por moléculas de agua (fig. 2-51).

Proteínas homólogas aisladas de diferentes organismos pueden presentar formas virtualmente idénticas y patrones de plegamiento, pero muestran gran divergencia en las secuencias aminoacídicas. Entre más grande sea la distancia evolutiva entre

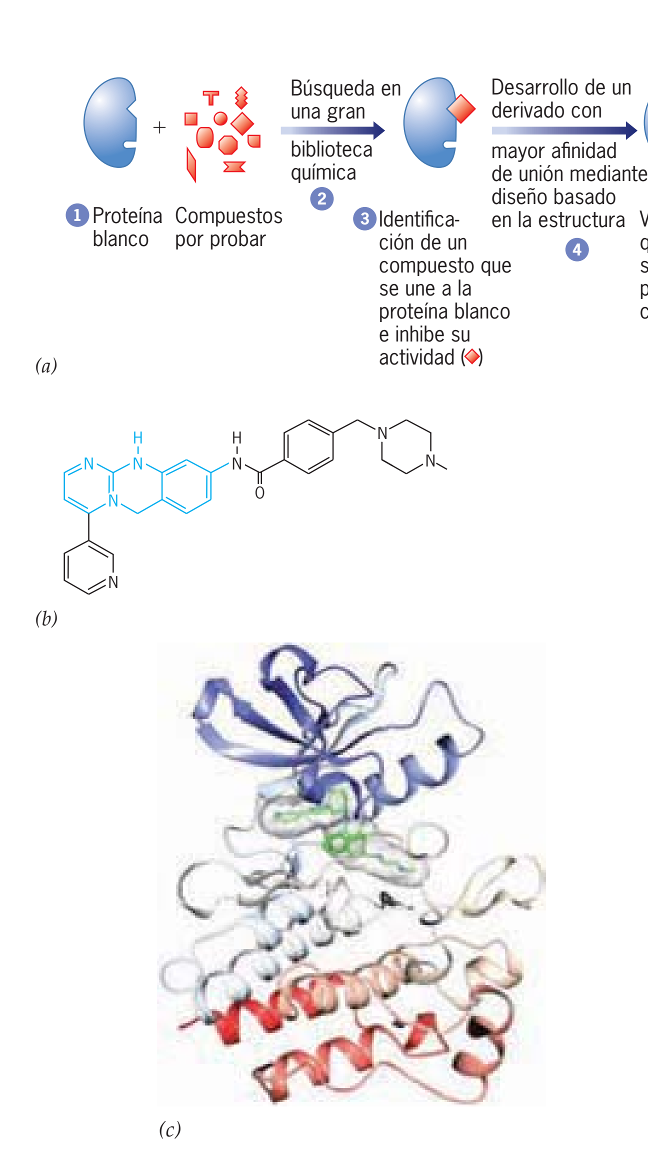


FIGURA 2-50 Desarrollo de un fármaco dirigido a una proteína, como el imatinib. *a*) Pasos típicos en el desarrollo de un fármaco. En el paso 1, se ha identificado una proteína (p. ej., ABL) que tiene una participación causal en la enfermedad. Esta proteína es un blanco probable para un fármaco que inhibe su actividad enzimática. En el paso 2, la proteína se incuba con miles de compuestos en busca de algunos que se unan con buena afinidad e inhiban su actividad. En el paso 3 se ha identificado uno de tales compuestos (p. ej., 2-fenilaminopirimidina en el caso de ABL). En el paso 4, el conocimiento de la estructura de la proteína blanco se usa para crear derivados del compuesto (p. ej., imatinib) que tienen mayor afinidad de unión y por tanto pueden usarse a menores concentraciones. En el paso 5, el compuesto en cuestión se prueba en experimentos preclínicos en cuanto a su toxicidad y eficacia in vivo. Los experimentos preclínicos suelen realizarse en células humanas cultivadas (paso 5a) (p. ej., de pacientes con CML) y animales de laboratorio (paso 5b) (p. ej., ratones que portan trasplantes de células de CML humana). Si el fármaco resulta ser seguro y eficaz en animales, se le somete a ensayos clínicos (paso 6) como se expone en la página 67. *b*) Estructura del imatinib. La parte azul de la molécula indica la estructura del compuesto 2-fenilaminopirimidina, que se identificó inicialmente como un inhibidor de la cinasa ABL. *c*) Estructura del dominio catalítico de ABL en complejo con imatinib (mostrado en verde). El fármaco se une a la conformación inactiva de la proteína e impide la activación que se requiere para el fenotipo canceroso de las células. (*C*, REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE MARTIN E.M. NOBLE ET AL., *SCIENCE* 303:1800, 2004, CORTESÍA DE LOUISE N. JOHNSON. COPYRIGHT © AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE.)

dos organismos, más grande es la diferencia en las secuencias de aminoácidos de sus proteínas. En algunos casos, sólo algunos aminoácidos localizados en una porción en especial crítica de la proteína están presentes en todos los organismos en los que la proteína se ha estudiado. Por ejemplo, una comparación de las secuencias de 226 globinas reveló que sólo dos residuos están absolutamente conservados en todos estos polipéptidos; uno es el residuo de histidina que juega un papel central en la unión y liberación de O_2. Estas observaciones indican que las estructuras secundaria y terciaria de las proteínas cambian con mucha más lentitud durante la evolución que sus estructuras primarias.

Se ha observado cómo la evolución ha generado diferentes versiones de proteínas en distintos organismos, pero esto también produce diferentes versiones de proteínas en organismos individuales. Considere una proteína en particular con una función específica, como globina o colágena. El genoma humano codifica diferentes versiones de cada una de estas proteínas. En la mayoría de los casos, distintas versiones de una proteína, las cuales se conocen como **isoformas**, se adaptan a la función en diferentes tejidos o estados del desarrollo. Por ejemplo, los seres humanos poseen seis distintos genes que codifican isoformas de la proteína contráctil actina. Dos de estas isoformas se encuentran en el músculo liso, uno en el músculo esquelético, uno en el corazón y dos en casi todos los tipos celulares.

A medida que se reportaron más y más secuencias de aminoácidos y estructuras terciarias de proteínas, fue evidente que casi todas las proteínas eran miembros de muchas grandes **familias** (o *superfamilias*) de moléculas relacionadas. Los genes que codifican los diferentes miembros de una familia de proteínas provienen al parecer de un gen ancestral único que sufrió duplicaciones durante la evolución (véase fig. 10-23). Durante largos periodos, la secuencia nucleótida de varias copias divergió la una de la otra para generar proteínas con estructuras relacionadas (*homólogas*). Muchas familias de proteínas contienen una notoria variedad de proteínas que han llevado a diversas funciones. La expansión de familias de proteínas es causante por mucho de la diversidad de proteínas codificadas en los genomas de las plantas y animales complejos de la actualidad.

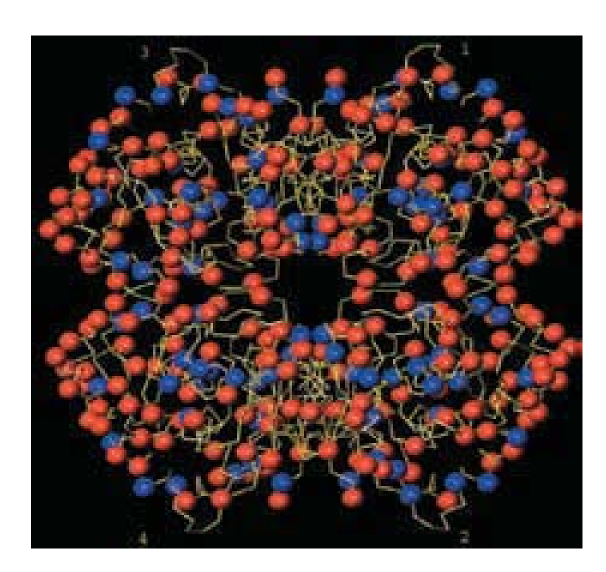
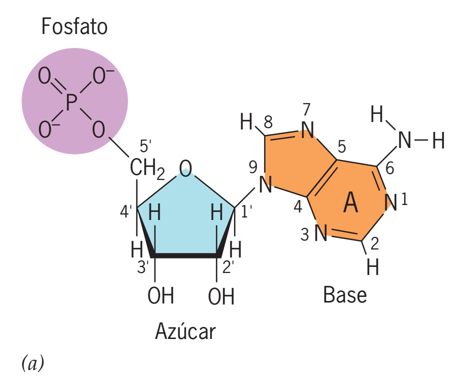


FIGURA 2-51 Distribución de residuos de aminoácidos polares cargados en la enzima deshidrogenasa de malato de una arqueobacteria halófila. Las esferas rojas representan los residuos ácidos y las esferas azules los residuos básicos. Se ha observado que la superficie de la enzima está cubierta con residuos ácidos, que le confieren a la proteína una carga neta de −156 que facilita su solubilidad en ambientes en extremo salinos. En comparación, una proteína homóloga del pez perro, un tiburón, tiene una carga neta de +16. (Reimpresa con autorización de O. Dym, M. Mevarech y J. L. Sussman, Science 267:1345, 1995. Copyright © 1995 American Association for the Advancement of Science.)

Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son macromoléculas construidas con largas cadenas (**secuencia**) de monómeros llamados **nucleótidos**. Los ácidos nucleicos funcionan de manera primaria como almacén y transmiten la información genética, pero también pueden tener funciones estructurales y catalíticas. Hay dos tipos de ácidos nucleicos que se hallan en los organismos vivos, **ácido desoxirribonucleico (DNA)** y **ácido ribonucleico (RNA)**. Como se observó en el capítulo 1, el DNA es el material genético de todos los organismos celulares y el RNA efectúa esta tarea para muchos virus. En las células, la información almacenada en el DNA se emplea para dirigir las actividades celulares durante la formación de RNA mensajero. En el presente análisis se examina la estructura básica de los ácidos nucleicos y se emplea al RNA como molécula representativa. En el capítulo 10 se describe la estructura del DNA, que se puede vincular con su papel central en las bases químicas de la vida.

En una cadena de RNA cada nucleótido consta de tres partes (fig. 2-52*a*): a) un azúcar de cinco carbonos, la ribosa; b) una base nitrogenada (así llamada porque en los anillos de su molécula se encuentran átomos de nitrógeno), y c) un grupo fosfato. La base de nitrógeno y el azúcar forman un *nucleósido,* de tal modo que los nucleótidos de una hebra de RNA se conocen también como monofosfatos de ribonucleósido. El fosfato está unido al carbono 5′ del azúcar y la base nitrogenada se conecta con el carbono 1′ de los azúcares. Durante el ensamblado de una cadena de ácido nucleico, el grupo hidroxilo fijado al carbono 3′



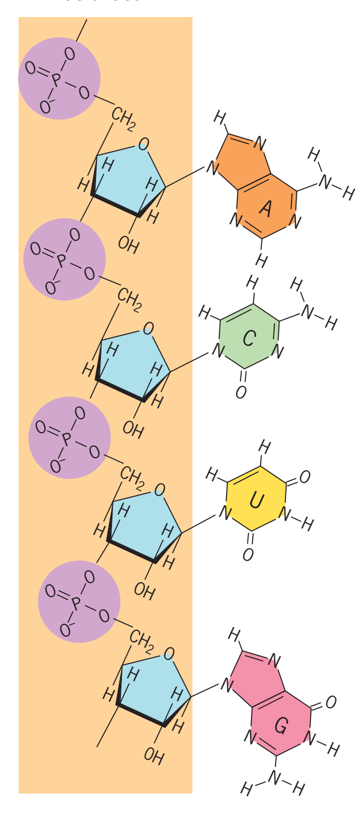


FIGURA 2-52 Nucleótidos y una cadena nucleotídica de RNA. *a*) Los nucleótidos son monómeros a partir de los cuales se construyen las cadenas de ácidos nucleicos. Un nucleótido consta de tres partes: un azúcar, una base nitrogenada y un fosfato. Los nucleótidos del RNA contienen el azúcar ribosa, el cual posee un grupo hidroxilo unido al segundo átomo de carbono. En cambio, los nucleótidos del DNA contienen el azúcar desoxirribosa, que muestra un átomo de hidrógeno, en lugar del grupo hidroxilo, unido al segundo átomo de carbono. Cada nucleótido está polarizado y tiene un extremo 5′ (que corresponde la posición 5′ del azúcar) y un extremo 3′. *b*) Los nucleótidos se unen para formar cadenas por medio de enlaces covalentes que unen el grupo hidroxilo 3′ de un azúcar con el grupo fosfato 5′ del azúcar adyacente.

del azúcar de un nucleótido queda unido mediante una unión éster al grupo fosfato unido al carbono 5′ del siguiente nucleóti-

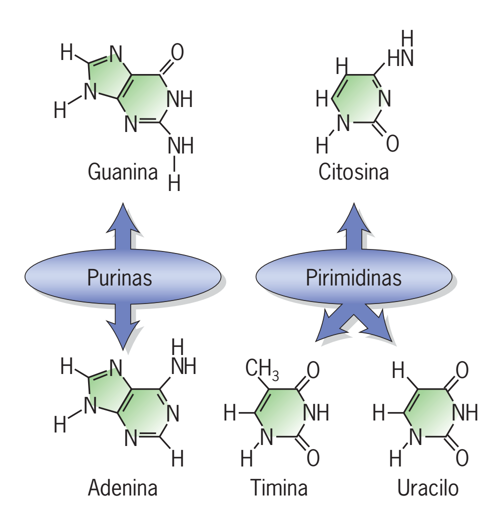


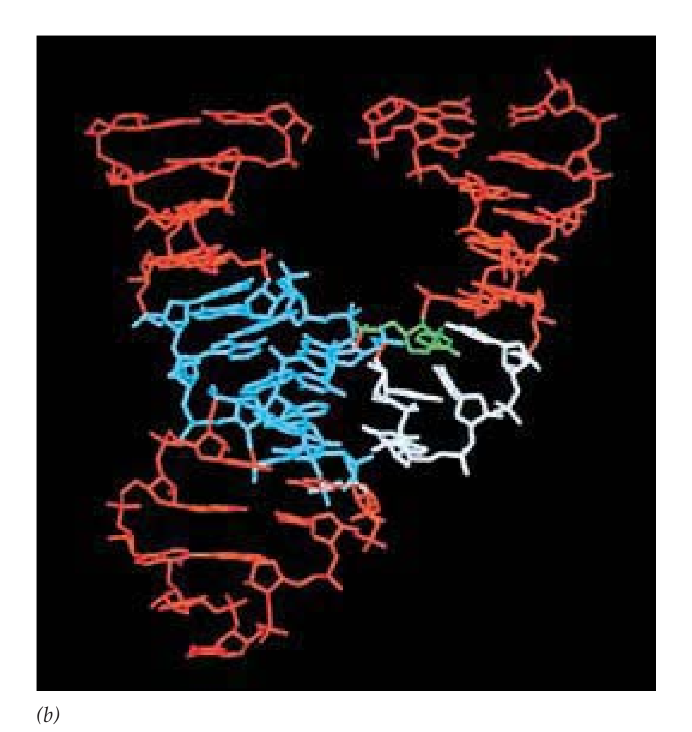
FIGURA 2-53 Las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos. De las cuatro bases comunes del RNA, la adenina y la guanina son purinas y el uracilo y la citosina son pirimidinas. En el DNA las pirimidinas son la citosina y la timina, que difieren del uracilo por un grupo metilo unido al anillo.

do de la cadena. Así, los nucleótidos de una cadena de RNA (o DNA) están conectados con enlaces azúcar-fosfato (fig. 2-52*b*), los cuales se describen como *enlaces 3′-5′ fosfodiéster* debido a que el átomo de fosfato está esterificado con los dos átomos de oxígeno, uno de cada dos azúcares adyacentes.

Una cadena de RNA (o DNA) contiene cuatro tipos diferentes de nucleótidos que se distinguen por su base nitrogenada. Dos tipos de bases se hallan en los ácidos nucleicos: pirimidinas y purinas (fig. 2-53). Las **pirimidinas** son moléculas más pequeñas que constan de un solo anillo; las **purinas** son más grandes y poseen dos anillos. El RNA tiene dos diferentes purinas, **adenina** y **guanina**, y dos pirimidinas distintas, **citosina** y **uracilo**. En el DNA, el uracilo se sustituye por **timina**, una pirimidina con un grupo metilo adicional pegado al anillo (fig. 2-53).

En condiciones típicas, el RNA consta de una sola cadena continua, pero a menudo se pliega para formar moléculas con extensos segmentos de doble cadena y estructuras complejas tridimensionales. Esto lo ilustran dos RNA que se muestran en la figura 2-54. El RNA cuya estructura secundaria se ilustra en la figura 2-54*a* es un componente de la subunidad pequeña del ribosoma bacteriano (véase fig. 2-55). Los RNA ribosómicos no son moléculas que porten información genética; más bien, sirven como andamiajes estructurales en los cuales las proteínas del ribosoma pueden unirse y son elementos que reconocen y unen varios componentes solubles requeridos para la síntesis proteica. Uno de los RNA ribosómicos de la subunidad mayor actúa como el catalítico para las reacciones por las cuales los aminoácidos se unen de forma covalente durante la síntesis de proteínas. Los RNA que tienen un papel catalítico se conocen como RNA enzimáticos, o **ribozimas**. La figura 2-54*b* muestra la estructura terciaria de la llamada ribozima cabeza de martillo, la cual es capaz de cortar su propia tira de RNA. En los dos ejemplos representados en la figura 2-54, las regiones de doble cadena se

(a)



(b)

FIGURA 2-54 Los RNA pueden adoptar estructuras complejas. *a*) Este RNA ribosómico es un componente de la subunidad pequeña del ribosoma bacteriano. En este esquema bidimensional se observa que la cadena de RNA se pliega sobre sí misma en un patrón muy ordenado, de tal manera que la mayor parte de la molécula es de doble cadena. *b*) Esta ribozima cabeza de martillo, como se conoce, es una pequeña molécula de RNA de un viroide (pág. 24). La naturaleza helicoidal de las porciones de doble cadena de este RNA se pueden observar en este modelo molecular tridimensional de la molécula. (*B*, TOMADA DE WILLIAM G. SCOTT, ET AL., CELL 1995;81:993; CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS.)

unen por medio de puentes de hidrógeno entre las bases. Por este mismo principio se mantienen juntas las dos cadenas de la molécula de DNA.

Los nucleótidos no tan sólo son importantes bloques de construcción de los ácidos nucleicos, sino que también poseen relevantes funciones por sí mismos. La mayor parte de la energía utilizable por todo organismo viviente en cualquier momento se deriva del nucleótido **trifosfato de adenosina (ATP)**. La estructura del ATP y su papel clave en el metabolismo celular se estudian en el siguiente capítulo. El **trifosfato de guanosina (GTP)** es otro nucleótido de enorme importancia en las actividades celulares. El GTP se une a una gran variedad de proteínas (llamadas proteínas G) y actúa como un interruptor para iniciar sus actividades (véase la fig. 11-49 para cotejar un ejemplo).

REVISIÓN ?

1. ¿Qué macromoléculas son polímeros?, ¿cuál es la estructura básica de cada tipo de monómero?, ¿cuánto varían entre sí los diferentes monómeros de cada tipo de macromolécula?
2. Describa la estructura de los nucleótidos y la manera en la cual estos monómeros se mantienen juntos para formar cadenas de polinucleótidos. ¿Por qué sería simplista describir el RNA como una cadena sencilla de ácido nucleico?
3. Nombre tres polisacáridos integrados por polímeros de glucosa. ¿Cómo difieren estas macromoléculas una de la otra?
4. Describa las propiedades de tres diferentes tipos de moléculas lipídicas. ¿Cuáles son sus funciones biológicas?
5. ¿Cuáles son las principales propiedades que distinguen a los distintos aminoácidos entre sí?, ¿qué funciones hacen que estas diferencias sean importantes en la estructura y función de las proteínas?
6. ¿Cuáles son las propiedades de la glicina, prolina y cisteína que diferencian a estos aminoácidos de todos los otros?
7. ¿Cuáles son las propiedades distintas de las hélices alfa respecto de las láminas beta?, ¿en qué son similares?
8. Debido a que las proteínas actúan como máquinas moleculares, explique por qué los cambios conformacionales son esenciales para la función proteica.

2.6 LA FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS MACROMOLECULARES COMPLEJAS

¿Hasta qué grado se pueden aplicar los conocimientos adquiridos del estudio de la configuración de proteínas a estructuras más complejas de las células?, ¿pueden las estructuras, como las membranas, ribosomas y elementos citoesqueléticos, que constan de diferentes tipos de subunidades, ensamblarse por sí solas?, ¿en qué proporción se puede explicar la organización subcelular si se colocan sólo pedazos unidos para formar el ordenamiento más estable? El ensamblado de los organelos celulares todavía se entiende muy poco, pero de los siguientes ejemplos se puede concluir que diferentes tipos de subunidades son capaces de autoensamblarse para formar disposiciones de orden más elevado.

Ensamblado de partículas del virus del mosaico del tabaco y sus subunidades ribosómicas

La prueba más convincente de que un proceso específico de ensamblado puede autodirigirse consiste en demostrar que bajo condiciones fisiológicas puede ocurrir fuera de la célula (in vitro) cuando las únicas macromoléculas presentes son aquellas que constituyen la estructura final. En 1955, Heinz Fraenkel-Conrat y Robley Williams de la *University of California*, *Berkeley*, demostraron que las partículas del TMV, las cuales poseen una larga molécula de RNA (alrededor de 6 600 nucleótidos), se enrollan dentro de una cápsula helicoidal de 2 130 subunidades proteicas idénticas (véase fig. 1-20) y son capaces de autoensamblarse. En sus experimentos purificaron el RNA del TMV y proteína de manera separada, los mezclaron bajo condiciones controladas y de nueva cuenta se obtuvo la estructura madura, con la consecución de partículas infectivas después de un corto periodo de incubación. Hay poco desacuerdo acerca de que los dos componentes contienen toda la información necesaria para la formación de partículas.

Los ribosomas, como las partículas del TMV, se forman con RNA y proteínas. A diferencia del TMV más simple, los ribosomas contienen varios tipos diferentes de RNA y un conjunto considerable de proteínas distintas. Todos los ribosomas, cualquiera que sea su origen, se componen de dos subunidades de diverso tamaño. Si bien las subunidades ribosómicas se consideran en general estructuras simétricas, en realidad tienen

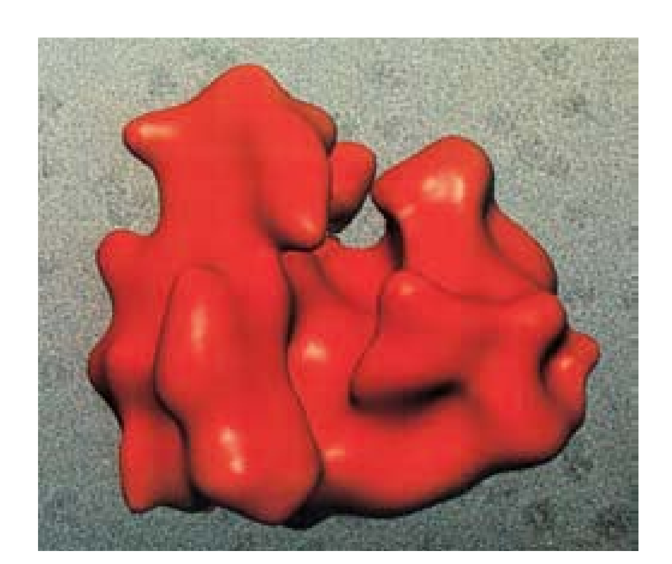


FIGURA 2-55 **Reconstrucción de un ribosoma citoplásmico de una célula de germen de trigo.** Esta reconstrucción se basa en micrografías de alta resolución y muestra las dos subunidades de este ribosoma eucariota, la subunidad pequeña (40S) a la izquierda y la grande (60S) a la derecha. La estructura interna de un ribosoma se describe en la sección 11.8. [TOMADA DE ADRIANA VERSCHOOR, ET AL., J CELL BIOL. VOL 133 (COVER #3), 1996; CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.]

una forma muy irregular, como se indica en la figura 2-55. La subunidad ribosómica grande (o 50S) de las bacterias contiene dos moléculas de RNA y cerca de 32 proteínas diferentes. La subunidad pequeña (o 30S) posee una molécula de RNA y 21 proteínas distintas. La estructura y función de los ribosomas se discuten con detalle en la sección 11.8.

Uno de los acontecimientos fundamentales en el estudio de los ribosomas sucedió a mediados de la década de 1960, cuando Masayasu Nomura y colaboradores de la *University of Wisconsin* lograron reconstituir subunidades 30S completas y del todo funcionales tras mezclar las 21 proteínas purificadas de la subunidad pequeña con RNA ribosómico purificado del mismo tipo de subunidad. Al parecer, los componentes de la subunidad pequeña contienen la información completa necesaria para acoplar toda la partícula. El análisis de los intermediarios que se forman en diferentes etapas de la reconstrucción in vitro indica que el ensamblado de subunidad ocurre de manera secuencial, paso a paso, muy semejante al proceso in vivo. Cuando menos una de las proteínas de la subunidad pequeña (S16) parece funcionar de manera exclusiva en el ensamble del ribosoma; la eliminación de esta proteína en la mezcla de reconstitución reduce en buena medida la tasa del proceso de armado, pero no bloquea la formación de los ribosomas funcionales completos. La reconstitución de una subunidad grande del ribosoma bacteriano se logró en el decenio siguiente. Debe recordarse que en tanto la reconstitución in vitro del ribosoma tarda cerca de dos horas a 50°C, la bacteria puede ensamblar la misma estructura en unos pocos minutos a temperaturas tan bajas como 10°C. Es posible que la bacteria utilice algo que no es evidente para el investigador y que inicia con componentes purificados. Por ejemplo, la formación del ribosoma dentro de la célula puede incluir la participación de factores accesorios que funcionan en el plegamiento de la proteína, como las chaperonas que se describen en la sección Vías experimentales. De hecho, la formación de ribosomas dentro de una célula *eucariota* requiere la congregación transitoria de muchas proteínas que no terminan en la partícula final y también la eliminación de casi la mitad de los nucleótidos del precursor del RNA ribosómico más grande (sección 11.3). Como resultado, los componentes del ribosoma eucariota maduro ya no poseen la información para reconstituirse por sí mismos in vitro.

REVISIÓN

1. ¿Qué tipo de evidencia sugiere que las subunidades ribosómicas bacterianas son capaces de autoensamblarse, pero no las subunidades eucariotas?
2. ¿Qué información indica que una proteína de ribosoma en particular tiene una función en el desempeño del ribosoma pero no en el ensamblado?

VÍAS EXPERIMENTALES

Chaperonas: proteínas colaboradoras que permiten un apropiado estado de plegamiento

En 1962, F. M. Ritossa, un biólogo italiano que estudiaba el desarrollo de la mosca de la fruta *Drosophila* sp., aportó un hallazgo curioso.[1] Cuando la temperatura en la cual la larva de la mosca de la fruta se desarrolla se aumenta de 25 a 32°C, un número de más sitios nuevos en el cromosoma gigante de las células de las larvas se activa. Como se observa en el capítulo 10, los cromosomas gigantes de estas larvas de insectos proveen una muestra visual de la expresión de genes (véase fig. 10-8). Los resultados sugieren que el incremento de la temperatura inducía la expresión de nuevos genes, un hallazgo que se confirmó una década más tarde con la caracterización de varias proteínas que aparecían en la larva después de elevar la temperatura.[2] Pronto se descubrió que esta reacción, conocida como **respuesta al choque térmico**, no era exclusiva de la mosca de la fruta, sino que también puede activarse en muchas otras células diferentes de virtualmente todo tipo de organismo desde bacterias hasta plantas y mamíferos. El examen minucioso reveló que las proteínas producidas durante la respuesta no se encontraban tan sólo en las células que sufrían el choque térmico, sino también en bajas concentraciones en células bajo condiciones normales. ¿Cuál es la función de estas llamadas *proteínas de choque térmico (hsps)*? La respuesta a esta pregunta se reveló de manera gradual por una serie de estudios al parecer sin relación.

En la página 77 se observó que algunos complejos, estructuras de multisubunidades, como los ribosomas bacterianos o una partícula del virus del mosaico del tabaco, pueden autoensamblarse a partir de subunidades purificadas. En la década de 1960 se demostró que las proteínas que forman las partículas de bacteriófago (véase fig. 1-21*c*) también poseen una importante capacidad para autoensamblarse, pero por lo general son incapaces de formar una partícula completa de virus funcional in vitro por sí mismas. Los experimentos de ensamblado del fago en células bacterianas confirmaron que los fagos requieren la ayuda de las bacterias. Por ejemplo, en el año 1973 se mostró que ciertas cepas mutantes de bacterias llamadas *GroE* no podían mantener el ensamblaje de los fagos normales. Según sea el tipo de fago, la cabeza o el tallo de la partícula del fago se ensamblaron de manera incorrecta.[3,4] Estos estudios sugirieron que una proteína codificada por el cromosoma bacteriano participaba en el ensamble de los virus, aunque esta proteína del huésped no fue un componente final de las partículas virales. Como desde luego no había evolucionado una ayuda para el ensamblaje de los virus, la proteína bacteriana requerida para el ensamblaje de los fagos tenía que desempeñar alguna función en las actividades normales de las células, pero el papel preciso que jugaban estas proteínas permanecía oscuro. Estudios subsecuentes revelaron que el

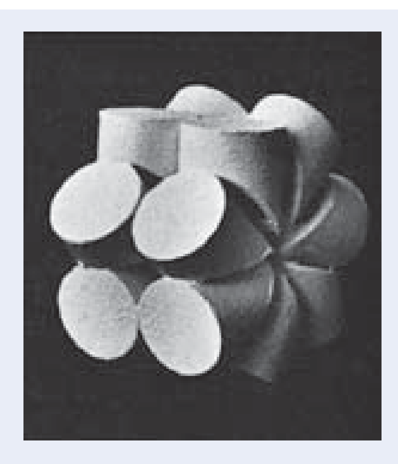


FIGURA 1 Un modelo del complejo GroEL armado de acuerdo con los datos de la microscopia electrónica y el peso molecular. Se observa que el complejo está formado por dos discos, cada uno integrado con siete subunidades idénticas ordenadas de manera simétrica alrededor de un eje central. Estudios posteriores mostraron que el complejo contiene una gran cámara interna. (TOMADA DE T. HOHN, ET AL., J. MOL. BIOL. 129:371, 1979. COPYRIGHT © 1979, CON AUTORIZACIÓN DE ACADEMIC PRESS, ELSEVIER SCIENCE.)

sitio *GroE* que se hallaba en los cromosomas bacterianos contenía dos genes separados, *GroEL* y *GroES*, que codifican dos proteínas independientes, GroEL y GroES. Bajo microscopio electrónico, la proteína purificada GroEL aparecía como una estructura ensamblada de forma cilíndrica conformada por dos discos. Cada disco estaba compuesto por siete subunidades acomodadas de manera simétrica alrededor de un eje central (fig. 1).[5,6]

En años posteriores, un estudio en plantas de chícharos destacaba la existencia de una proteína similar que promovía el ensamblaje en los cloroplastos de las plantas.[7] La rubisco es una gran proteína de los cloroplastos que cataliza la reacción en la cual las moléculas de CO_2 que toman de la atmósfera se unen de forma covalente a moléculas orgánicas durante la fotosíntesis (sección 6.6). La enzima rubisco comprende 16 subunidades: ocho pequeñas (de masa molecular de 14 000 Da) y ocho grandes (55 000 Da). Se encontró que la subunidad grande de rubisco se sintetizaba dentro del cloroplasto y no presentaba un estado independiente, pero se relacionaba con una proteína de ensamblaje importante integrada por subunidades idénticas de 60 000 Da (60 kDa) de masa molecular. En este artículo, los investigadores consideraron la posibilidad que el complejo formado por la subunidad grande de rubisco y el polipéptido de 60 kDa era un intermediario en el ensamblaje de una molécula de rubisco completa.

Una línea de investigación separada en las células de mamíferos también reveló la existencia de proteínas que al parecer ayudaban al ensamblaje de las multisubunidades proteicas. De modo semejante a la rubisco, las moléculas de anticuerpo poseían un complejo de dos diferentes tipos de subunidades, las cadenas ligeras más pequeñas y las cadenas pesadas más largas. Al igual que las subunidades grandes de la rubisco, se vincularon con otra proteína no encontrada en el complejo final, así como también las cadenas pesadas de un complejo de anticuerpos.[8] Esta proteína, la cual se relaciona con las cadenas pesadas recién sintetizadas, pero no con las cadenas pesadas ya unidas a las cadenas ligeras, se conoció como *proteína de enlace*, o BiP. Más adelante se descubrió que la proteína BiP tenía una masa molecular de 70 000 Da (70 kDa).

Se han elegido dos líneas de investigación: una concerniente a la reacción al choque térmico y la otra en relación con las proteínas que promueven el ensamblaje proteico. Estos dos campos convergieron en 1986, cuando se mostró que una de las proteínas que figura de manera más importante en la respuesta al choque térmico, una entidad llamada *proteína de choque térmico 70 (hsp70)* debido a su masa molecular, se identificó como la BiP, la proteína participante en el ensamblaje de moléculas de anticuerpo.[9]

Antes del descubrimiento de la respuesta al choque térmico se conoció que la estructura de las proteínas era sensible a la temperatura; un pequeño aumento de ésta daba lugar a que las moléculas delicadas alteraran su plegamiento. El mecanismo de desplegamiento expone los residuos hidrófobos que estaban alojados en el núcleo de la proteína. Tal y como las moléculas de grasa en un tazón de sopa se agrupan en gotas, así también las proteínas con los segmentos hidrófobos en su superficie. En consecuencia, cuando la célula sufre un choque de calor, las proteínas solubles se desnaturalizan y forman agregados. Un informe de 1985 demostró que, luego de la elevación de la temperatura, las moléculas de hsp70 recién sintetizadas entraban al núcleo celular, se unían a agregados de proteínas nucleares y actuaban como una palanca molecular que promovía la disgregación.[10] Debido a su contribución en el ensamblaje de las proteínas al prevenir las interacciones indeseables, la proteína hsp70 y las moléculas relacionadas recibieron el nombre de **chaperonas moleculares**.[11]

Pronto se demostró que las proteínas de choque término bacterianas GroEL y la rubisco ensambladora de proteínas en las plantas eran homólogos. De hecho, las dos proteínas mostraban los mismos aminoácidos en alrededor de la mitad de más de 500 residuos en sus respectivas moléculas.[12] Que dos proteínas —ambas de la *familia de chaperonas Hsp60*— retuvieran muchos de los aminoácidos semejantes reflejaba sus funciones esenciales y similares en los dos tipos de células. ¿Pero cuál era su función esencial? En este punto se pensó que su papel primario era mediar el ensamblaje de complejos de multisubunidades, como las partículas de bacteriófago o rubisco. Esta visión se cambió tras los experimentos que estudiaban a las chaperonas moleculares en la mitocondria. Se conoció que las proteínas recién sintetizadas en la mitocondria producidas en el citosol debían cruzar la membrana externa mitocondrial en una forma no plegada y extendida en forma monomérica. Se encontró un mutante que tenía alterada la actividad de otro miembro de la familia de chaperonas Hsp60 que permanece dentro de la mitocondria. En las células que contenían esta chaperona mutante, las proteínas que se transportaban dentro de la mitocondria tenían dificultad para plegarse dentro de su forma activa.[13] De la misma forma, las proteínas que poseían una cadena polipeptídica simple fallaban para plegarse en sus conformaciones nativas. Este hallazgo cambió la percepción de la función de las chaperonas; no se trataba de entidades que facilitaban sólo el ensamblado de subunidades ya plegadas en grandes complejos, sino que también contribuían al desplegamiento de las cadenas polipeptídicas.

Los resultados de estos y otros estudios indicaron la presencia en células de al menos dos principales familias de chaperonas moleculares: las chaperonas Hsp70, como la BiP, y las chaperonas Hsp60 (las cuales también se conocen como *chaperoninas*), como la Hsp60, GroEL y la proteína que ensambla a la rubisco. En seguida se describen las chaperoninas Hsp60, por ejemplo, la GroEL, cuya comprensión es mejor.

Según la primera revelación en el año de 1979, GroEL era un complejo molecular enorme de 14 subunidades polipeptídicas dispuestas en dos estructuras similares a una rosquilla doble.[5,6] Quince años más tarde se analizaron estas micrografías electrónicas primarias y se determinó la estructura tridimensional de los complejos de GroEL por cristalografía de rayos X.[14] El estudio reveló la presencia de una cavidad central dentro del cilindro de GroEL. Estudios subsecuentes demostraron que esta cavidad estaba dividida en dos cámaras separadas, una en cada extremo del complejo. Cada cámara se hallaba dentro del centro de uno de los anillos del complejo GroEL y era suficientemente grande para encerrar el proceso de plegamiento para un polipéptido.

Los estudios de microscopia electrónica también suministraron información acerca de la función de una segunda proteína, GroES, la

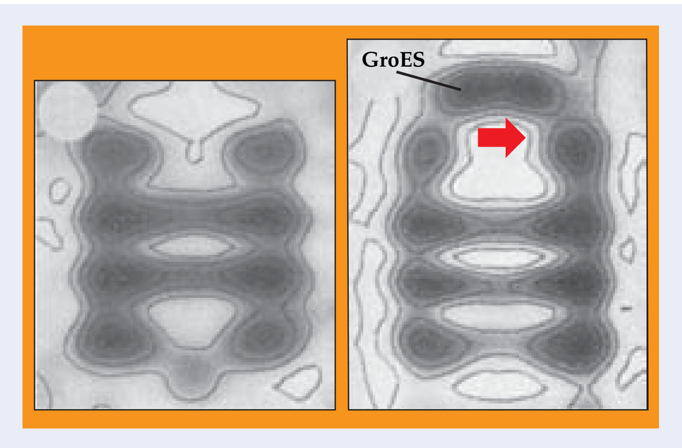


FIGURA 2 Reconstrucciones de GroEL con base en los datos de micrografías electrónicas de alta resolución obtenidas de muestras congeladas en etano líquido y examinadas a –170°C. La imagen de la izquierda muestra al complejo de GroEL y la de la derecha el complejo de GroEL con GroES, que forma un domo en un extremo del cilindro. Es evidente que la unión de GroES se acompaña de un cambio conformacional del extremo apical de las proteínas que forman el extremo superior del anillo GroEL (flecha), lo que crea mayor espacio en la cámara superior. (Reimpresa con autorización de S. Chen, et al., cortesía de Helen R. Saibil, Nature 371:263, 1994. Copyright © 1994 Macmillan Magazines Limited.)

cual actúa en conjunción con GroEL. Del mismo modo que GroEL, GroES es una proteína semejante a un anillo con siete subunidades colocadas de forma simétrica alrededor de un eje central. Sin embargo, GroES consiste sólo en un anillo y tiene subunidades mucho más pequeñas (10 000 Da) que la proteína GroEL (60 000 Da). GroES se observa como una tapa o domo que cubre la parte superior del cilindro de GroEL (fig. 2). La unión de GroES con el extremo de GroEL propicia un cambio conformacional notable en la proteína GroEL que incrementa el volumen de la cámara en el extremo del complejo.[15]

La importancia de estos cambios conformacionales se ha puesto de manifiesto con detalle en la cristalografía de rayos X realizada en los laboratorios de Arthur Horwich y Paul Sigler de la *Yale University*.[16] Como se muestra en la figura 3, la unión de la tapa de GroES tiene lugar junto con una rotación de 60° en el dominio apical (rojo) de la subunidad que hace el anillo de GroEL en el extremo del cilindro de GroEL. La unión de GroES hace mucho más que activar los cambios conformacionales que aumentan la cámara de GroEL. Antes de la unión de GroES, las paredes de la cámara de GroEL han expuesto los residuos hidrófobos que le confieren un carácter hidrófobo. Los polipéptidos que no son nativos también exponen sus residuos hidrófobos ocultos en el interior del polipéptido nativo. Debido a que las superficies hidrófobas tienen una tendencia a interaccionar, las porciones hidrófobas de la cavidad de GroEL se unen a la superficie de los polipéptidos que no son nativos. La unión de GroES a GroEL oculta los residuos hidrófobos de la pared de GroEL y expone un número de diferentes residuos polares, de tal forma que cambia el carácter de las paredes de la cámara. Como resultado de esta transformación, el polipéptido no nativo unido a las paredes de GroEL por interacciones hidrófobas se desplaza en el espacio dentro de la cámara. Una vez liberado de sus uniones a la pared de la cámara, el polipéptido tiene la oportunidad de continuar su plegamiento en un ambiente protegido. Después de unos 15 segundos, la capa de GroES se disocia del anillo de GroEL y el polipéptido se expulsa de la cámara. Si el polipéptido no alcanza su conformación nativa se expele y puede de nueva cuenta unirse al mismo u otro GroEL y el proceso se repite. En la figura 4 se muestra el modelo que trata de explicar algunos de los pasos que ocurren durante el proceso de la asistencia de GroEL-GroES para plegamiento.

Un estudio reciente indica que unas 250 de las aproximadamente 2 400 proteínas presentes en el citosol de una célula de *E. coli* interactúan normalmente con GroEL.[17] ¿De qué forma pueda unirse una chaperona a diferentes polipéptidos? El sitio de unión de GroEL posee una superficie hidrófoba, formada por dos hélices alfa de los dominios apicales, capaz de unir virtualmente cualquier secuencia de residuos hidrófobos accesible en un polipéptido plegado en parte o no plegado.[18] Una comparación de la estructura cristalina de la molécula GroEL sin unir con la GroEL unida a diferentes péptidos reveló que el sitio de unión del dominio apical de la subunidad de GroEL puede ajustarse de modo local y adecuar su posición cuando se unen diferentes péptidos. Este hallazgo indicó que el sitio de unión tiene flexibilidad estructural que permite moldear su forma y llenar el espacio de la estructura del polipéptido en particular con el cual interactúa.

Se piensa en las proteínas como moléculas muy especializadas que tienen un efecto tremendo en un número limitado de sucesos. Por ejemplo, la mayoría de las enzimas puede acelerar la velocidad de las reacciones a un grado notorio, pero sólo para algunas reacciones relacionadas.

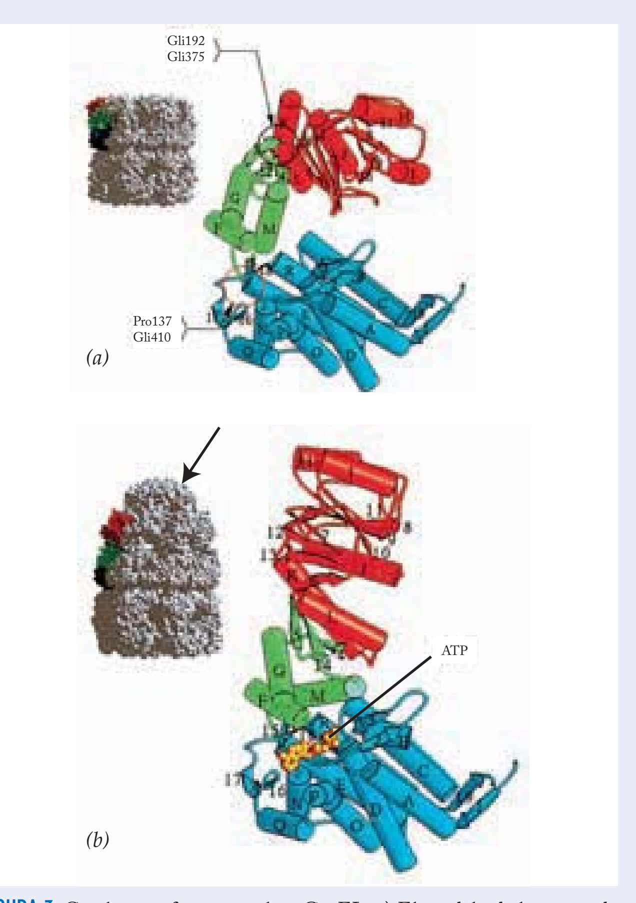


FIGURA 3 Cambio conformacional en GroEL. *a*) El modelo de la izquierda muestra la superficie de la estructura de los dos anillos formada por la chaperonina GroEL. El dibujo de la derecha ilustra la estructura terciaria de una de las subunidades de la parte superior del anillo de GroEL. Se puede observar que la cadena polipeptídica se pliega en tres dominios. *b*) Cuando un anillo de GroES (flecha) se une a un cilindro de GroEL, el dominio apical de cada subunidad de GroEL del anillo adyacente sufre una rotación notable de unos 60° con el dominio intermedio (que se muestra en verde), y actúa como una bisagra. El efecto de este cambio en partes del polipéptido es una marcada elevación de la pared de GroEL y un agrandamiento de la cámara formada. (Reimpresa con autorización de Z. Xu, A. L. Horwich y P. B. Sigler, Nature 388:744, 1997. Copyright © 1997 Macmillan Magazines Limited.)

GroEL, a diferencia de lo anterior, es capaz de promover el plegamiento de un amplio espectro de proteínas no relacionadas, lo cual ha llevado a describirlas como "máquinas de plegamiento para muchas proteínas pero no para una sola".[19] De acuerdo con este concepto, la estructura de GroEL-GroES es un "compromiso" que permite a las chaperoninas apoyar a una gran variedad de proteínas en algún grado sin que lo haga con otras de modo notable. Esta visión de GroEL-GroES ha recibido el apoyo de un estudio en el cual se indujo la mutagénesis dirigida para modificar un residuo aminoacídico clave, Tir71 del GroES, cuya cadena lateral sobresale de la parte superior de la cámara.[20] Debido a su anillo aromático, la tirosina es un aminoácido un poco hidrófobo (fig. 2-26). Cuando la Tir71 se cambió por un aminoácido con carga positiva o negativa, la variante GroEL-GroES resultante tenía una capacidad incrementada para favorecer el plegamiento del péptido específico, la proteína verde fluorescente (GFP). No obstante, las sustituciones de la Tir71 que mejoraron la capacidad de GroES-GroEL para plegar GFP provocaron que esta chaperonina redujera la capacidad para asistir el plegamiento de sustratos naturales. Conforme la chaperonina logró tener mayor especialidad para interactuar con la GFP, perdió su propiedad para facilitar el plegado de proteínas de estructura no relacionada. Este hallazgo sugiere que los aminoácidos individuales que forman la pared de la cámara de plegamiento pueden participar en la reacción de plegamiento. En otras palabras, las chaperoninas podrían hacer más que sólo suministrar una cámara pasiva donde las proteínas puedan plegarse sin interferencia externa.[21]

Debe tenerse presente que las chaperonas moleculares no portan información para el proceso de plegamiento, sino que impiden el plegamiento incorrecto de las proteínas o su agregación. Como descubrió Anfinsen décadas atrás, la estructura tridimensional de una proteína es determinada por su secuencia de aminoácidos.

Referencias

1. Ritossa, F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila. Experentia* 18:571–573.
2. Tissieres, A., Mitchell, H. K., & Tracy, U. M. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosomal puffs. *J. Mol. Biol.* 84:389–398.
3. Sternberg, N. 1973. Properties of a mutant of *Escherichia coli* defective in bacteriophage lambda head formation (groE). *J. Mol. Biol.* 76:1–23.
4. Georgopoulos, C. P., et al. 1973. Host participation in bacteriophage lambda head assembly. *J. Mol. Biol.* 76:45–60.
5. Hohn, T., et al. 1979. Isolation and characterization of the host protein groE involved in bacteriophage lambda assembly. *J. Mol. Biol.* 129:359–373.
6. Hendrix, R. W. 1979. Purification and properties of groE, a host protein involved in bacteriophage assembly. *J. Mol. Biol.* 129: 375–392.
7. Barraclough, R. & Ellis, R. J. 1980. Protein synthesis in chloroplasts. IX. *Biochim. Biophys. Acta* 608:19–31.
8. Haas, I. G. & Wabl, M. 1983. Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 306:387–389.
9. Munro, S. & Pelham, H. R. B. 1986. An Hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78 kD glucose-regulated protein and immunoglobin heavy chain binding protein. *Cell* 46:291–300.
10. Lewis, M. J. & Pelham, H. R. B. 1985. Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions of the 70kD heat-shock protein. *EMBO J.* 4:3137–3143.
11. Ellis, J. 1987. Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328:378–379.
12. Hemmingsen, S. M., et al. 1988. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333:330–334.

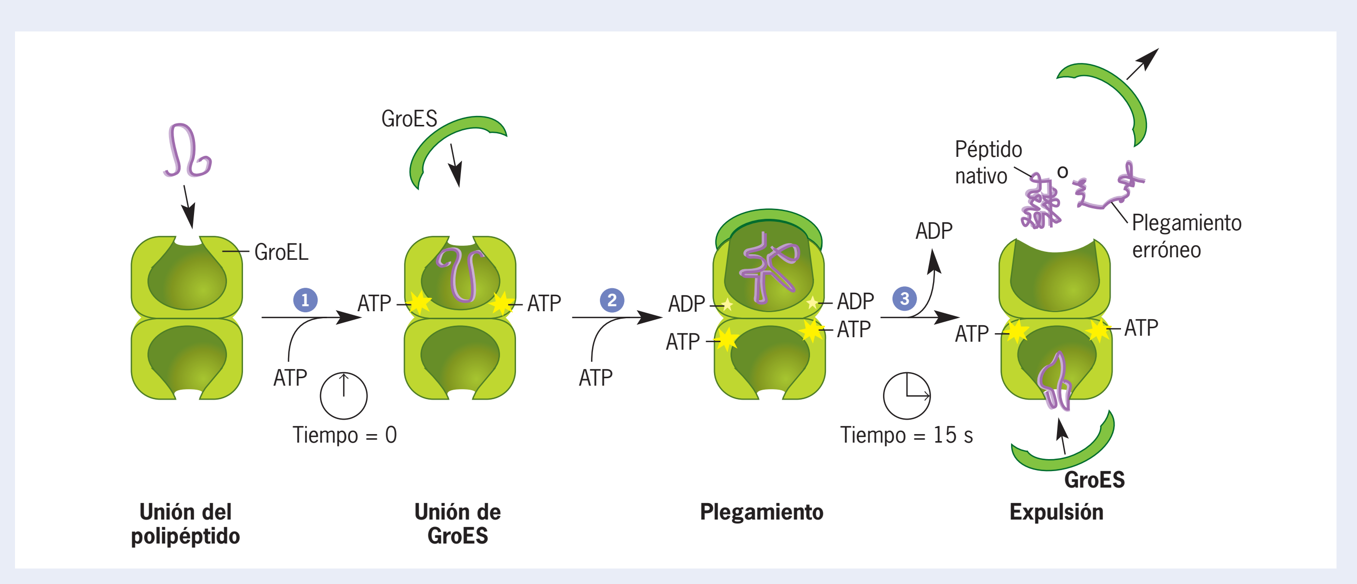


FIGURA 4 Ilustración esquemática de los pasos propuestos que ocurren durante el plegamiento de un polipéptido con la ayuda de GroEL-GroES. Se ha observado que GroEL tiene dos cámaras con estructuras y funciones equivalentes y que se alternan durante su actividad. Cada cámara se localiza dentro de uno de los dos anillos que forman los complejos GroEL. El polipéptido no nativo entra a una de las cámaras (paso 1) y se une a los sitios hidrófobos de la pared de la cámara. La unión de GroES genera un cambio conformacional en la pared de la parte superior de la cámara y da lugar a un agrandamiento de la cámara y liberación del polipéptido no nativo de la pared dentro del espacio cerrado de la cámara (paso 2). Después de unos 15 segundos, GroES se disocia del complejo y el polipéptido se expulsa de la cámara (paso 3). Si el polipéptido adquiere su conformación nativa, como en la molécula de la izquierda, el proceso de plegamiento se completa. Sin embargo, si el polipéptido se pliega parcialmente, o lo hace de manera errónea, otra vez se une a la cámara de GroEL para iniciar otro ciclo de plegamiento. (*Nota:* como se indica, el mecanismo de acción de GroEL lo controlan la unión e hidrólisis del ATP, una molécula rica en energía cuya función se discute en extenso en el capítulo siguiente.) (A partir de A. L. Horwich, et al., Proc Nat'l Acad Sci USA 96:11037, 1999.)

13. Cheng, M. Y., et al. 1989. Mitochondrial heat-shock protein Hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature* 337:620–625.

14. Braig, K., et al. 1994. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8A. *Nature* 371:578–586.

15. Chen, S., et al. 1994. Location of a folding protein and shape changes in GroEL-GroES complexes. *Nature* 371:261–264.

16. Xu, Z., Horwich, A. L., & Sigler, P. B. 1997. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-$(ADP)_7$ chaperonin complex. *Nature* 388:741–750.

17. Kerner, M. J., et al. 2005. Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. *Cell* 122:209–220.

18. Chen, L. & Sigler, P. 1999. The crystal structure of a GroEL/peptide complex: plasticity as a basis for substrate diversity. *Cell* 99:757–768.

19. Erbse, A., et al. 2003. A folding machine for many but a master of none. *Nature Struct. Biol.* 10:84-86.

20. Wang, J. D., et al. 2002. Directed evolution of substrate-optimized GroEL/S chaperonins. *Cell* 111:1027-1039.

21. Ellis, R. J. 2006. Inside the cage. *Nature* 442:360-362.

SINOPSIS

Los enlaces covalentes mantienen unidos los átomos para formar moléculas. Los enlaces covalentes son estructuras estables que se forman cuando los átomos comparten los electrones de su capa externa, de manera que cada uno completa dicha capa. Los enlaces covalentes pueden ser simples, dobles o triples, según sea el número de pares de electrones compartidos. Si los electrones que forman el enlace se comparten de modo desigual, el átomo con mayor fuerza de atracción (el más electronegativo) posee carga parcial negativa, en tanto que el otro átomo adquiere carga parcial positiva. Las moléculas sin enlaces polarizados son no polares o hidrófobas e insolubles en agua. Las moléculas con enlaces polarizados son polares o hidrófilas y solubles en agua. Las moléculas polares de importancia biológica contienen uno o más átomos electronegativos, por lo general O, N, S o P (pág. 32).

Las fuerzas de atracción débiles forman enlaces no covalentes dentro de la misma molécula o entre dos moléculas cercanas en regiones con cargas positiva y negativa. Los enlaces no covalentes tienen una función clave al mantener la estructura de las moléculas biológicas y mediar sus actividades dinámicas. Los enlaces no covalentes incluyen enlaces iónicos, puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. Los enlaces iónicos se forman entre grupos cargados de manera positiva y negativa; los puentes de hidrógeno se crean entre un átomo de hidrógeno unido de modo covalente (el cual porta una carga parcial positiva) y un átomo de nitrógeno u oxígeno también unido de forma covalente (que porta una carga parcial negativa); las fuerzas de van der Waals se ejercen entre dos átomos con carga transitoria debido a una asimetría momentánea y a la distribución de los electrones que rodean a los átomos. Las moléculas no polares o segmentos no polares de moléculas más grandes en medio acuoso tienden a agruparse para establecer interacciones hidrófobas. Ejemplos de los tipos de interacciones no covalentes incluyen la vinculación del DNA y proteínas mediante enlaces iónicos, la complementación de las cadenas del DNA a través de puentes de hidrógeno y la formación del núcleo hidrófobo en las proteínas solubles como resultado de las interacciones hidrófobas y las fuerzas de van der Waals (pág. 33).

El agua tiene propiedades únicas que mantienen la vida. Los enlaces covalentes que conforman una molécula de agua están muy polarizados. Por lo tanto, el agua es un excelente solvente capaz de formar puentes de hidrógeno prácticamente con todas las moléculas polares. El agua también es un determinante principal de la estructura de las moléculas biológicas y las interacciones en las que participa. El pH de una solución es una medida de la concentración de iones hidrógeno (hidronio). La mayor parte de los procesos biológicos es muy sensible al pH porque los cambios en la concentración del ion hidrógeno alteran el estado iónico de las moléculas biológicas. Las células están protegidas de las variaciones de pH por amortiguadores, compuestos que reaccionan con iones hidrógeno o hidroxilo (pág. 37).

Los átomos de carbono desempeñan una función importante en la formación de las moléculas biológicas. Cada átomo de carbono tiene capacidad para establecer enlaces hasta con cuatro átomos, que pueden ser otros átomos de carbono. Esta propiedad le permite formar moléculas grandes cuyo esqueleto consiste en una cadena de átomos de carbono. Las moléculas que sólo contienen hidrógeno y carbono se denominan hidrocarburos. La mayor parte de las moléculas de importancia biológica posee grupos funcionales que incluyen uno o más átomos electronegativos que tornan a la molécula más polar, hidrosoluble y reactiva (pág. 40).

Las moléculas biológicas son miembros de cuatro grupos importantes: carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Los carbohidratos incluyen a los azúcares simples y grandes moléculas (polisacáridos) elaboradas con monómeros de azúcar. Los carbohidratos funcionan de manera primaria como almacén de energía química y como material durable para la construcción biológica. Los azúcares simples de importancia biológica se integran con esqueletos de tres a siete átomos de carbono, con cada carbono unido a dos grupos hidroxilo menos uno, que posee un grupo carbonilo. Los azúcares con cinco o más átomos de carbono reaccionan de modo espontáneo para crear moléculas en forma de anillo. Los átomos de carbono situados a lo largo del esqueleto del azúcar unidos a cuatro grupos diferentes son sitios de estereoisomerismo y generan pares de isómeros que no pueden superponerse. El carbono asimétrico más alejado del carbonilo determina si el azúcar es D o L. Los azúcares se unen entre sí mediante enlaces glucosídicos para formar disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. En animales el azúcar se almacena sobre todo como glucógeno, un polisacárido ramificado que constituye una fuente de energía rápidamente disponible. En las plantas, las reservas de glucosa se almacenan como almidón, una mezcla de amilosa no ramificada y amilopectina ramificada. La mayor parte de los azúcares, tanto glucógeno como almidón, se unen por medio de enlaces $\alpha(1 \rightarrow 4)$. La celulosa es un polisacárido estructural elaborado por células vegetales que constituye el componente principal de la pared celular. En la celulosa los monómeros de la glucosa se unen por enlaces del tipo $\beta(1 \rightarrow 4)$, que pueden cortarse por efecto de la celulasa, una enzima que no está presente en los animales. La quitina es un polisacárido estructural compuesto por monómeros *N*-acetilglucosamina (pág. 42).

Los lípidos son un ordenamiento diverso de moléculas hidrófobas que tienen diferente estructura y funciones. Las grasas se conforman con moléculas de glicerol esterificado a tres ácidos grasos. Los ácidos grasos difieren en la longitud de su cadena, número y posición de sus enlaces dobles (sitios de insaturación). Las grasas son muy ricas en energía química; un gramo de grasa contiene más de dos veces la energía que posee un gramo de carbohidrato. Los esteroides son un grupo de lípidos que contienen un esqueleto hidrocarbonado característico

de cuatro anillos. Entre los esteroides se incluye al colesterol así como a diferentes hormonas (p. ej., testosterona, estrógeno y progesterona), que se sintetizan a partir del colesterol. Los fosfolípidos son moléculas lipídicas que contienen fosfato, poseen extremos hidrófilos e hidrófobos y desempeñan un papel importante en la estructura y función de las membranas celulares (pág. 47).

Las proteínas son macromoléculas con funciones diversas constituidas por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos que forman cadenas polipeptídicas. Los diferentes ordenamientos de las proteínas incluyen enzimas, materiales estructurales, receptores membranosos, factores que regulan genes, hormonas, agentes transportadores y anticuerpos. El orden en el que se incorporan los 20 aminoácidos en una proteína está codificado en la secuencia nucleotídica del DNA. Los 20 aminoácidos muestran una organización estructural común consistente en un carbono alfa unido a un grupo amino, un grupo carboxilo y una cadena lateral de estructura variable. En el presente esquema, las cadenas laterales se clasifican en cuatro categorías: con carga neta a pH fisiológico; los que son polares, pero sin carga y que son capaces de formar puentes de hidrógeno; no polares que interactúan por medio de fuerzas de van der Waals; y tres aminoácidos (prolina, cisteína y glicina) que poseen propiedades únicas (pág. 49).

La estructura de las proteínas puede describirse en cuatro niveles de complejidad incrementada de forma gradual. La estructura primaria se describe por medio de la secuencia aminoacídica de un polipéptido; la estructura secundaria a través de la estructura tridimensional (conformación) de secciones del esqueleto polipeptídico; la estructura terciaria por la conformación del polipéptido entero, y la estructura cuaternaria por la disposición de las subunidades si la proteína tiene más de una cadena polipeptídica. La hélice alfa y la hoja beta plegada son estables, en particular las estructuras secundarias vinculadas por puentes de hidrógeno que son comunes en muchas proteínas. La estructura terciaria de una proteína es muy compleja y única para cada tipo individual de proteína. La gran mayoría de las proteínas posee una estructura globular en la que la cadena polipeptídica se pliega para formar una molécula compacta en donde los residuos específicos están situados de manera conveniente, lo cual posibilita que la proteína realice una función específica. La mayor parte de las proteínas muestra dos o más dominios que mantienen una independencia de estructura y función. Al utilizar la técnica de mutagénesis dirigida, los investigadores han dilucidado la función de residuos aminoacídicos específicos al efectuar sustituciones específicas. En años recientes, un nuevo campo de la proteómica ha aparecido y usa nuevas tecnologías, como la espectroscopia de masas y el uso de computadoras, para estudiar las diferentes propiedades de las proteínas a gran escala. Las distintas interacciones entre las 6 000 proteínas codificadas por el genoma de la levadura que se han analizado por diferentes tecnologías son un ejemplo (pág. 54).

La información que se requiere para que una cadena polipeptídica adquiera su conformación nativa está codificada en su estructura primaria. Algunas proteínas se pliegan en su estructura terminal de manera espontánea; otras necesitan la ayuda de chaperonas inespecíficas, que evitan la agregación de los intermediarios del plegamiento (pág. 63).

Los ácidos nucleicos son sobre todo moléculas informacionales que consisten en cadenas integradas por monómeros de nucleótidos. Cada nucleótido es una cadena que posee un azúcar, un fosfato y una base nitrogenada. Los nucleótidos se unen mediante enlaces entre el grupo hidroxilo 3′ del azúcar de un nucleótido y el grupo 5′ fosfato del nucleótido adyacente. El RNA y el DNA se ensamblan a partir de los cuatro nucleótidos diferentes que se distinguen por sus bases que pueden ser pirimidinas (citosina o uracilo/timina) o purinas (adenina o guanina). El DNA es una doble cadena de ácidos nucleicos y el RNA es por lo regular una cadena sencilla y plegada sobre sí misma con secciones de doble cadena. La información en los ácidos nucleicos está codificada en la secuencia específica de nucleótidos que forman la cadena (pág. 75).

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. La anemia de células falciformes se induce por una sustitución de una valina por un ácido glutámico. ¿Qué efecto se esperaría si la alteración fuera un cambio por el aminoácido leucina en este sitio?, ¿o un ácido aspártico?
2. De los aminoácidos glicina, isoleucina y lisina, ¿cuál sería el más soluble en una solución acuosa ácida y cuál el menos soluble?
3. ¿Cuántos isómeros estructurales pueden formarse a partir de moléculas con las fórmulas C_5H_{12} y C_4H_8?
4. El gliceraldehído es una aldotetrosa de tres carbonos que puede existir como dos estereoisómeros. ¿Cuál es la estructura de la única cetotriosa, la dihidroxiacetona?, ¿cuántos estereoisómeros forma?
5. Se sabe que las bacterias cambian sus ácidos grasos con las fluctuaciones de la temperatura de su ambiente. ¿Qué cambios esperaría en los ácidos grasos con el descenso de la temperatura?, ¿por qué lo anterior se considera adaptativo?
6. En la cadena polipeptídica —C—C—N—C—C—N—C—C—NH_2, identifique los carbonos alfa.
7. ¿Cuál de los siguientes enunciados es verdadero? El aumento del pH en una solución debería: a) suprimir la disociación de un ácido carboxílico, b) incrementar la carga en los grupos amino, c) aumentar la disociación de los ácidos carboxílicos, d) anular la carga en los grupos amino.
8. ¿Cuál de los cuatro tipos de aminoácidos tiene cadenas laterales con mayor potencial para formar puentes de hidrógeno?, ¿cuál posee mayor potencial para formar enlaces iónicos e interacciones hidrófobas?
9. Si las tres enzimas del complejo de la deshidrogenasa de piruvato existieran como proteínas separadas en lugar de formar una unidad, ¿qué efecto se observaría sobre la velocidad de las reacciones catalizadas por estas enzimas?
10. ¿Existe acuerdo acerca de que la ribonucleasa y la mioglobina carecen de estructura cuaternaria?, ¿por qué sí o por qué no?
11. ¿Cuántos tripéptidos diferentes son posibles?, ¿cuántos carboxilos terminales presentan las cadenas de polipéptidos en una molécula de hemoglobina?
12. Se ha aislado un pentapéptido compuesto de cuatro residuos de glicina y uno de lisina en el C terminal del péptido. Con base en la información suministrada en el pie de la figura 2-27, si la pK de la cadena lateral de la lisina es 10 y la del grupo carboxiterminal es 4, ¿cuál es la estructura del péptido a pH de 7 y 12?
13. Las cadenas laterales del ácido glutámico (pK, 4.3) y la arginina (pK, 12.5) pueden formar un enlace iónico bajo ciertas condiciones. Trace las porciones relevantes de las cadenas laterales e indique si es posible formar un enlace iónico en las condiciones siguientes: a) pH 4; b) pH 7; c) pH 12, y d) pH 13.

14. ¿Es posible que una solución con alta concentración de sales desnaturalice a una ribonucleasa?, ¿por qué sí o por qué no?

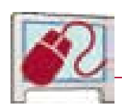
15. Se estableció en la sección Perspectiva humana que: a) las mutaciones en el gen *PRNP* pueden propiciar que un polipéptido adquiera la conformación PrP^{Sc}, lo cual causa CJD, y b) la exposición a la proteína prión PrP^{Sc} puede provocar una infección que desarrolla CJD. ¿Cómo explica la aparición de casos esporádicos de la enfermedad en personas que no tienen el riesgo por antecedentes hereditarios?

16. Las personas que nacen con síndrome de Down tienen una tercera copia (extra) del cromosoma 21 en sus células. El cromosoma 21 contiene el gen que codifica la proteína APP. ¿Cuál cree que sea la causa de que los individuos con síndrome de Down desarrollen enfermedad de Alzheimer a una edad temprana?

17. Se mencionó en la página 74 que la evolución posibilitó la existencia de familias de proteínas compuestas por proteínas relacionadas con funciones similares. Son pocos los ejemplos que se conocen de proteínas con funciones muy semejantes y estructuras primaria y terciaria que no tengan evidencia de relación evolutiva. Por ejemplo, las proteínas subtilisina y tripsina son dos enzimas que digieren proteínas (proteasas), que carecen de evidencia de homología entre ellas a pesar de usar semejantes mecanismos para abordar los sustratos. ¿Cómo se puede explicar esta coincidencia entre estas proteínas?

18. ¿Estaría de acuerdo con el enunciado según el cual muchas secuencias diferentes de aminoácidos pueden plegarse en la misma estructura terciaria básica?, ¿qué datos lo apoyan?

19. En palabras de un científico: "Cuando a cualquier biólogo estructural se le dice que se ha dilucidado una nueva estructura [proteínica], la primera pregunta que hace ya no es '¿*Qué* parece ser?', sino '¿*A qué* se parece?'" ¿Qué cree usted que significa este enunciado?



SITIO EN INTERNET www.wiley.com/college/karp

Las animaciones y los videos indicados en este capítulo pueden visitarse en el sitio de Cell and Molecular Biology de Karp en Internet. También hallará todas las respuestas a las preguntas analíticas recién planteadas, autoexámenes que le ayudarán a prepararse para los exámenes, y vínculos con fascinantes recursos. La sección lecturas adicionales que sigue se amplía en el sitio en Internet.

LECTURAS ADICIONALES

Bioquímica general

Berg, J. M., Stryer, L., & Tymoczko, J. L. 2002. *Biochemistry*, 5th ed. W. H. Freeman.

Nelson, D. L., et al. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed. Worth.

Voet, D. & Voet, J. G. 2004. *Biochemistry*, 4th ed., 2 vols. Wiley.

Temas adicionales

Bader, J. S. & Chant, J. 2006. When proteomes collide. *Science* 311:187–188. [protein interaction networks]

Baselga, J. & Arribas, J. 2004. Treating cancer's kinase addiction. *Nature Med*. 10:786–787.

Beal, M. F. 2005. Less stress, longer life. *Nature Med*. 11:598–599.

Bordone, L. & Guarente, L. 2005. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nature Revs. Mol. Cell Biol*. 6:298–305.

Carrell, R. W. 2004. Prion dormancy and disease. *Science* 306:1692–1693.

Coombes, K. R., et al. 2005 Serum proteomics profiling—a young technology begins to mature. *Nature Biotech*. 23:291–292.

De Hoog, C. L. & Mann, M. 2004. Proteomics. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet*. 5:267–293.

Dobson, C. M. 2003. Protein folding and misfolding. *Nature* 426:884–890.

Enserink, M. 2005. After the crisis: more questions about prions. *Science* 310:1756–1758.

Fink, A. L. 2005. Natively unfolded proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15:35–41.

Kabuyama, Y., et al. 2004. Applying proteomics to signaling networks. *Curr. Opin. Gen. Develop.* 14:492–498.

Kelly, J. W. 2006. Proteins downhill all the way. *Nature* 442:255–256.

Kirkwood, T. B. L., et al. 2005. Reviews on aging. *Cell* 120:#4.

Lindorff-Larsen, K., et al. 2005. Protein folding and the organization of the protein topology universe. *Trends Biochem. Sci.* 30:13–19.

Mattison, J. A., et al. 2003. Calorie restriction in rhesus monkeys. *Exp. Gerontol.* 38:35–46.

Raschke, T. M. 2006. Water structure and interactions with protein surfaces. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16:152–159.

Roder, H. 2004. Stepwise helix formation and chain compaction during protein folding. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 101:1793–1794.

Sali, A., et al. 2005. Macromolecular assemblies highlighted. *Structure* 13:339–388.

Service, R. F. 2005. Structural genomics, round 2. *Science* 307:1554–1557.

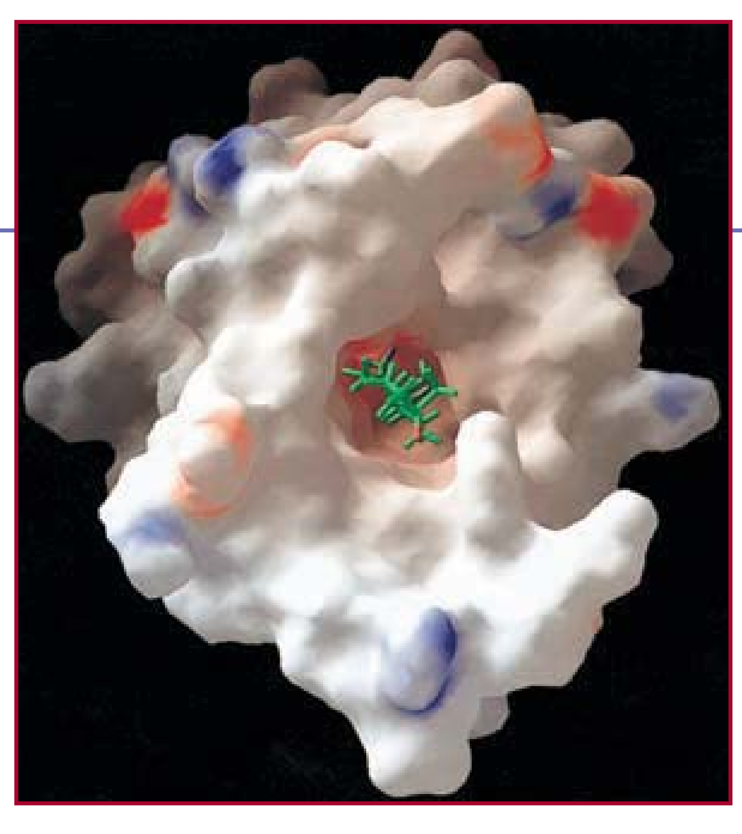
Thiel, K. A. 2004. Structure-aided drug design's next generation. *Nature Biotech*. 22:513–520.

Tomlinson, I. M. 2004. Next-generation protein drugs. *Nature Biotech*. 22:521–522.

Yates, J. R., et al. 2005. Proteomics of organelles and large cellular structures. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 6:702–714.

Young, J. C. et al. 2004. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 5:781–791.

CAPÍTULO 3



Bioenergética, enzimas y metabolismo

La interrelación de la estructura con la función es evidente en todos los niveles en la organización biológica, desde el molecular hasta el de organismos. En el capítulo anterior se observó que las proteínas tienen una estructura tridimensional intrincada que depende de la presencia de residuos de aminoácidos particulares en las posiciones precisas. En este capítulo se describe con mayor detalle a un gran grupo de proteínas, las enzimas, y se explica cómo su compleja estructura les confiere la capacidad de aumentar en grado notable la velocidad de las reacciones biológicas. Para comprender la forma en que las enzimas pueden lograr esto es necesario considerar el flujo de energía durante una reacción química, lo que conduce al tema de la termodinámica. Un breve estudio de los principios de la termodinámica también ayuda a explicar muchos de los procesos celulares que se tratan en este capítulo y los siguientes, incluidos el movimiento de iones a través de las membranas, la síntesis de macromoléculas y el ensamble de las redes citoesqueléticas. Como se indica después, el análisis termodinámico de un sistema particular puede revelar si los sucesos suelen ocurrir en forma espontánea; de no ser así, proporcionan una medida de la energía que una célula debe gastar para que se lleve a cabo el proceso. En la última parte de esta sección se describe la manera en que se vinculan las reacciones químicas individuales para formar vías metabólicas y la forma en que puede controlarse el flujo de energía y materias primas a través de ciertas vías. ●

El modelo muestra la superficie de la enzima isomerasa de Δ^5-3-cetoesteroide con una molécula sustrato (verde) en el sitio activo. El carácter electrostático de la superficie se indica con el color (rojo, ácido; azul, alcalino). (Reimpresa con autorización de Zheng Rong Wu, et al., Science 276:417, 1997, cortesía de Michael F. Summers, University of Maryland, Baltimore County; copyright 1997, American Association for the Advancement of Science.)

3.1 BIOENERGÉTICA

Una célula viva está llena de actividad. Se conforman macromoléculas de todos tipos a partir de materias primas, se producen y eliminan compuestos de desecho, las instrucciones genéticas fluyen del núcleo al citoplasma, se mueven vesículas a lo largo de la vía secretora, se bombean iones a través de las membranas celulares, etc. Para mantener un nivel tan alto de actividad, la célula debe adquirir y gastar energía. El estudio de los diversos tipos de transformaciones energéticas que ocurren en los organismos vivos se conoce como **bioenergética**.

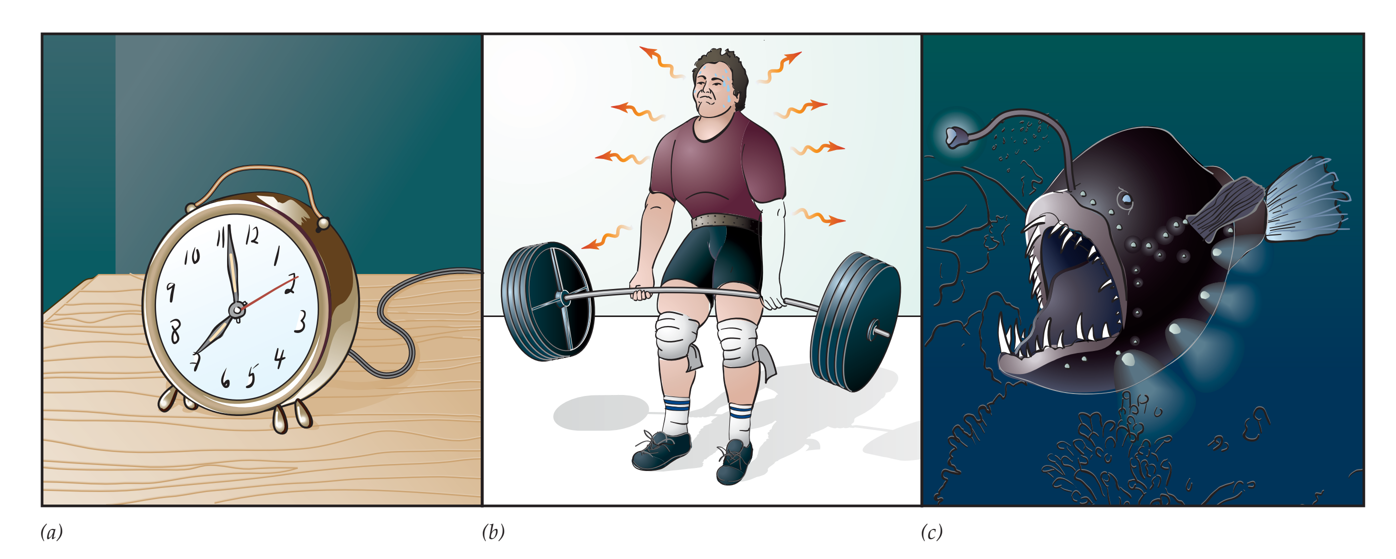
Las leyes de la termodinámica y el concepto de entropía

La **energía** se define como la capacidad de realizar trabajo, es decir, la posibilidad para cambiar o mover algo. La **termodinámica** es el estudio de los cambios de la energía que acompañan a los sucesos del universo. Las páginas siguientes se enfocan en un conjunto de conceptos que permiten predecir la dirección que toman tales sucesos y la posible necesidad del aporte de energía para hacer que el episodio ocurra. Sin embargo, las mediciones termodinámicas no suministran ayuda para establecer la rapidez con la que tiene lugar un proceso específico o el mecanismo particular que utiliza la célula para llevar a cabo el proceso.

Primera ley de la termodinámica **La primera ley de la termodinámica** se refiere a la conservación de la energía. Señala que la energía no puede crearse ni destruirse. Empero, la energía puede transformarse (*transducirse*) de una forma a otra. La energía eléctrica se convierte en energía mecánica cuando se conecta un reloj a la corriente (fig. 3-1*a*) y la energía química se transforma en energía térmica cuando se quema combustible en un calentador de aceite. Las células también son capaces de transducir energía. Como se describe en capítulos posteriores, la energía química almacenada en ciertas moléculas biológicas, en forma de ATP (trifosfato de adenosina), se convierte en energía mecánica cuando los organelos se mueven de un sitio a otro dentro de la célula, a energía eléctrica cuando los iones fluyen a través de una membrana o a energía térmica cuando se libera calor durante la contracción de las células musculares (fig. 3-1*b*). La transducción energética más importante en el mundo biológico es la conversión de la luz solar en energía química, el proceso de la fotosíntesis, que proporciona el combustible que de manera directa o indirecta impulsa las actividades de casi todas las formas de vida.[1] Hay diversos animales, incluidas las luciérnagas y los peces luminosos, que pueden convertir la energía química de nueva cuenta en luz (fig. 3-1*c*). Sin embargo, sin importar cuál sea el proceso de transducción, la cantidad total de energía en el universo permanece constante.

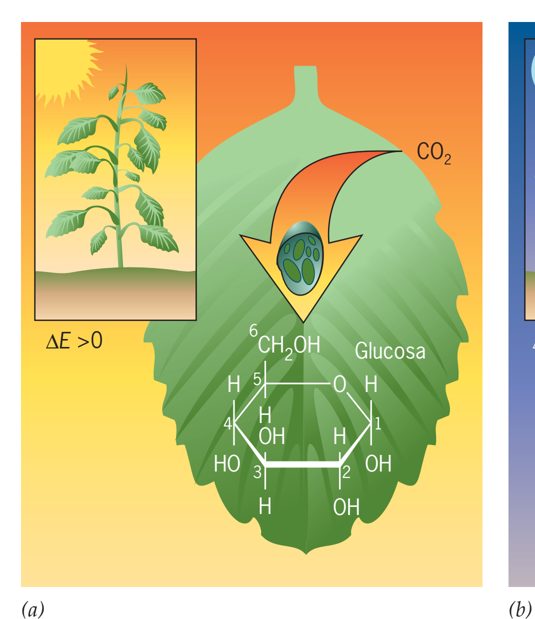
Para discutir las transformaciones energéticas que implican materia, es necesario dividir el universo en dos partes: el *sistema* en estudio y el resto del universo, al que se denomina *ambiente*. Un sistema puede definirse de varias formas: puede ser un espacio determinado en el universo o una cierta cantidad de materia. Por ejemplo, el sistema puede ser una célula viva. Los cambios de la energía de un sistema que ocurren durante un suceso se manifiestan de dos maneras: como cambio en el contenido de calor del sistema y como desempeño de un trabajo. Aunque el sistema pierda o gane energía, la primera ley de la termodinámica indica que la pérdida o ganancia deben equilibrarse con una ganancia o pérdida correspondiente en el ambiente, de manera que la cantidad en el universo permanece constante. La energía del sistema se conoce como *energía interna* (E) y su cambio durante una transformación es ΔE (delta E). Una manera de

[1] Se conocen varias comunidades de organismos que son independientes de la fotosíntesis, entre ellas las que residen en las chimeneas hidrotermales en el fondo del lecho marino que dependen de la energía obtenida de la síntesis química bacteriana.

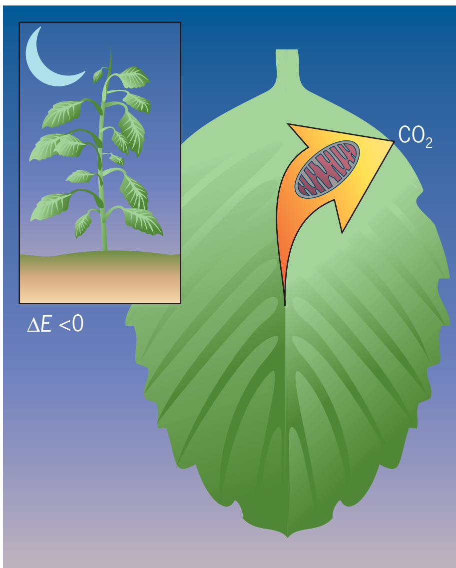


(*a*) (*b*) (*c*)

FIGURA 3-1 **Ejemplos de transducción energética.** *a*) Conversión de energía eléctrica en energía mecánica. *b*) Conversión de energía química en mecánica y térmica. *c*) Conversión de energía química en energía luminosa.



(a)



(b)

FIGURA 3-2 Un cambio de la energía interna de un sistema. En este ejemplo, el sistema se define como una hoja particular de una planta. *a*) Durante el día, los pigmentos fotosintéticos en los cloroplastos de la hoja absorben la luz solar y la utilizan para convertir CO_2 en carbohidratos, como la molécula de glucosa que se muestra en el dibujo (que luego se incorpora en la sacarosa o almidón). Conforme la célula absorbe luz, su energía interna aumenta; la energía presente en el resto del universo tiene que disminuir. *b*) Durante la noche, la relación energética entre la célula y su ambiente se invierte y los carbohidratos producidos durante el día se oxidan hasta CO_2 en las mitocondrias; la energía se emplea para realizar las actividades nocturnas de la célula.

describir la primera ley de la termodinámica es $\Delta E = Q - W$, donde Q es la energía calórica y W la energía de trabajo.

Según sea el proceso, al final la energía interna del sistema puede ser mayor, igual o menor que la energía interna al principio, de acuerdo con su relación con el ambiente (fig. 3-2). En otras palabras, ΔE puede ser positiva, cero o negativa. Considérese que un sistema es el contenido de un vaso de reacciones. Mientras no haya un cambio de la presión o volumen del contenido, el sistema no realiza trabajo sobre el ambiente ni viceversa. En ese caso, la energía interna al final de la transformación es mayor que la del principio, si se absorbe calor, y menor si se libera calor. Las reacciones que pierden calor se llaman **exotérmicas**, las que ganan calor son **endotérmicas** y hay muchas reacciones de ambos tipos. Como ΔE para una reacción particular puede ser positiva o negativa, no proporciona información sobre la probabilidad de que ocurra un fenómeno determinado. Para establecer la probabilidad de una transformación particular es necesario considerar algunos conceptos adicionales.

Segunda ley de la termodinámica **La segunda ley de la termodinámica** expresa el concepto de que los fenómenos tienen en el universo una dirección; tienden a proceder "colina abajo" de un estado de mayor energía a un estado de menor energía. Por lo tanto, en cualquier transformación energética hay una disponibilidad decreciente de energía para efectuar un trabajo adicional. Las rocas caen de los riscos hacia el suelo y una vez en él, se reduce su capacidad para realizar trabajo adicional; es muy improbable que se eleven por sí mismas de nueva cuenta hacia la cima del risco. De igual manera, en condiciones normales las cargas contrarias se atraen, no se separan, y el calor fluye de un cuerpo más cálido a uno más frío, no a la inversa. Se dice que estos fenómenos son **espontáneos**, término que indica que son favorables desde el punto de vista termodinámico y que pueden ocurrir *sin el ingreso de energía externa*.

En su origen, el concepto de la segunda ley de la termodinámica se formuló para las máquinas de calor y la ley conllevaba la idea inherente de que es imposible construir una máquina de movimiento perpetuo en un sentido termodinámico. En otras palabras, es imposible que una máquina tenga una eficiencia de 100%, requisito indispensable para que continúe su funcionamiento sin el ingreso de energía externa. Es inevitable que se pierda parte de la energía cuando la máquina funciona. Una relación similar se aplica a los organismos vivos. Por ejemplo, cuando una jirafa ramonea las hojas de un árbol o un león caza a la jirafa, la mayor parte de la energía química del alimento nunca queda disponible para el animal que come.

La pérdida de la energía disponible durante un proceso es resultado de una tendencia al azar, o desorden, del universo para aumentar cada vez que hay una transferencia de energía. Esta ganancia en desorden se mide con el término **entropía** y la pérdida de energía disponible es igual a $T\Delta S$, donde ΔS es el cambio de la entropía entre los estados inicial y final. La entropía se relaciona con los movimientos *aleatorios* de las partículas de la materia que, por ser azarosos, no pueden realizar un proceso de trabajo *directo*. De acuerdo con la segunda ley de la termodinámica, todo fenómeno se acompaña de un aumento de la entropía del universo. Por ejemplo, cuando un terrón de azúcar se sumerge en una taza de agua caliente hay un cambio espontáneo de las moléculas de un estado ordenado en el cristal a una condición mucho más desordenada cuando las moléculas de azúcar se dispersan en toda la solución (fig. 3-3*a*). Conforme las moléculas del terrón se disuelven en la solución, aumenta su libertad de movimiento, al igual que la entropía del sistema. El cambio de un estado concentrado a uno disperso se debe a los movimientos aleatorios de las moléculas. Al final, las moléculas de azúcar se distribuyen por igual en todo el volumen disponible porque el estado de distribución uniforme es el estado más probable.

La liberación de calor, como en el caso de la oxidación de la glucosa dentro de una célula o por la fricción generada cuando la sangre fluye por un vaso, es otro ejemplo de un incremento de la entropía. La liberación de energía térmica por parte de los organismos vivos aumenta la velocidad de los movimientos

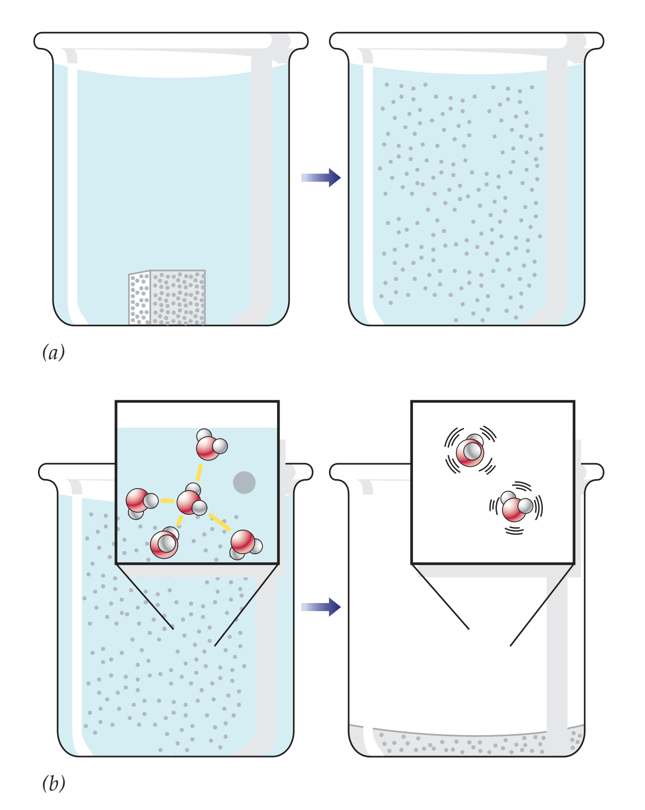


FIGURA 3-3 **Fenómenos acompañados por un aumento de la entropía del universo.** *a*) Un terrón de azúcar contiene moléculas de sacarosa con una disposición muy ordenada, con restricción de la libertad de movimiento de las moléculas individuales. A medida que el cubo se disuelve, la libertad de movimiento de las moléculas de sacarosa aumenta en grado considerable y su movimiento aleatorio hace que se distribuyan por igual en todo el espacio disponible. Una vez que esto ocurre, ya no hay tendencia a distribuirse de nueva cuenta y la entropía del sistema está en su nivel máximo. *b*) Las moléculas de azúcar dispersadas al azar en toda la solución pueden regresar a su estado ordenado, pero sólo si aumenta la entropía del ambiente, como ocurre cuando las moléculas de agua más ordenadas de la fase líquida se desordenan después de la evaporación.

aleatorios de los átomos y las moléculas; no puede dirigirse para realizar trabajo adicional. Tal y como la energía de los movimientos moleculares y atómicos se incrementa con la temperatura, también lo hace la entropía. Sólo en el cero absoluto (0 K), cuando todos los movimientos cesan, la entropía es cero.

Como sucede con otros fenómenos espontáneos, es preciso distinguir entre el sistema y su ambiente. La segunda ley de la termodinámica indica sólo que la entropía total en el universo debe aumentar; el desorden dentro de una parte del universo (el sistema) puede reducirse en mayor medida que su ambiente. El azúcar disuelto en la figura 3-3*a* puede disminuir de entropía; puede cristalizarse de nuevo si se evapora el agua (fig. 3-3*b*). No obstante, la consecuencia de este proceso es un aumento de la entropía del ambiente. La mayor libertad de movimiento de las moléculas de agua en la fase gaseosa equilibra en exceso la disminución de libertad de las moléculas de los cristales de azúcar.

La vida opera bajo un principio similar. Los organismos vivos pueden atenuar su propia entropía si aumentan la entropía del ambiente. La entropía disminuye en un organismo cuando las moléculas relativamente simples, como los aminoácidos, se ordenan en moléculas más complejas, como la proteína mioglobina de una célula muscular. Sin embargo, para que esto ocurra debe aumentar la entropía del ambiente, lo cual se logra cuando las moléculas complejas y ordenadas, como el glucógeno almacenado en el hígado o tejido muscular, se convierten en calor y se liberan compuestos más pequeños y menos ordenados (como CO_2 y H_2O) hacia el ambiente. Esta es la característica del metabolismo que permite a los organismos vivos mantener un estado muy ordenado e improbable, por lo menos por un tiempo.

Otra medida del estado de energía de un organismo vivo se obtiene del contenido de información de sus macromoléculas. La información es un tema difícil de definir, pero fácil de reconocer. La información puede medirse en términos de la disposición ordenada de las subunidades de una estructura. Por ejemplo, las proteínas y ácidos nucleicos, en los que la secuencia lineal específica de las subunidades es muy ordenada, son bajos en entropía y altos en contenido de información. Para mantener un estado de elevado contenido de información (entropía baja) se requiere una entrada de energía. Considérese sólo una molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico) localizada en una célula en el hígado. Esa célula tiene docenas de proteínas diferentes cuya única función es vigilar el DNA, buscar lesión y repararlo (se describe con más amplitud en la sección 13.2). El daño en los nucleótidos de una célula activa puede ser tan grande que, sin este gasto de energía, el contenido de información del DNA se deterioraría con rapidez. Los organismos con mayor capacidad para reducir la velocidad del aumento inevitable de la entropía tienen una mayor esperanza de vida (pág. 34).

Energía libre

Juntas, la primera y la segunda leyes de la termodinámica indican que la energía del universo es constante, pero la entropía continúa en aumento hacia un máximo. En 1878, el químico estadounidense J. Willard Gibbs combinó los conceptos inherentes en las primeras dos leyes en la expresión $\Delta H = \Delta G + T\Delta S$, donde ΔG (delta G) es el cambio de **energía libre**, esto es, el cambio de la energía durante un proceso que está disponible para realizar trabajo; ΔH es el cambio de la *entalpía* o contenido total de energía del sistema (para los fines de este texto, equivalente a ΔE); T es la temperatura absoluta (K = °C + 273), y ΔS es el cambio de la entropía del sistema. La ecuación establece que el cambio de la energía total es igual a la suma de los cambios de la energía útil (ΔG) y la energía que no está disponible para hacer trabajo adicional ($T\Delta S$).

Cuando se corrige la expresión y se escribe como $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, la ecuación anterior proporciona una medida de la espontaneidad de un proceso particular. Hace posible predecir la dirección en la que el proceso avanzará y la extensión en la que ocurrirá. Todas las transformaciones energéticas *espontáneas* deben tener una ΔG negativa, es decir, el proceso debe avanzar hacia el estado de menor energía libre. La magnitud de ΔG indica la cantidad máxima de energía que puede pasarse para usarla en otro proceso, pero no dice nada sobre la rapidez con la que el proceso ocurrirá. Los procesos que pueden producirse

FIGURA 3-4 **Cuando el agua se congela**, su entropía disminuye porque las moléculas de agua del hielo existen en un estado más ordenado con menor libertad de movimiento que en el estado líquido. El descenso de la entropía es muy aparente en la formación de un copo de nieve. (COPYRIGHT, NURIDSANY AND PERENNOU/PHOTO RESEARCHERS.)

en forma espontánea, esto es, los que están favorecidos desde el punto de vista termodinámico (que tienen una ΔG negativa), se describen como **exergónicos**. En cambio, si la ΔG para un proceso determinado es positiva, no puede producirse de manera espontánea. Estos procesos son desfavorables desde el punto de vista termodinámico y se describen como **endergónicos**. Como se describe más adelante, se puede hacer que las reacciones que en condiciones normales son endergónicas sucedan si se unen con procesos liberadores de energía.

Los signos de ΔH y ΔS para una transformación determinada pueden ser positivos o negativos, según sea la relación entre el sistema y su ambiente. (Por lo tanto, ΔH es positiva si el sistema gana calor y negativa si se pierde; ΔS es positiva si el sistema se vuelve más desordenado y negativa si se torna más ordenado.) La interrelación de ΔH con ΔS se ilustra con la transformación entre hielo y agua. El paso del agua del estado líquido al sólido se acompaña de un descenso de la entropía (ΔS es negativa, como se ilustra en la figura 3-4) y un decremento de la entalpía (ΔH es negativa). Para que esta transformación ocurra (es decir, para que ΔG sea negativa), ΔH debe ser más negativa que $T\Delta S$, una condición que sólo ocurre por debajo de 0°C. Esta relación puede verse en el cuadro 3-1, que indica los valores para los diferentes términos si un mol de agua se convirtiera en hielo a 10, 0 o −10°C. En todos los casos, sin importar cuál sea la temperatura, el nivel de energía del hielo es menor al del líquido (la ΔH es negativa). No obstante, a una temperatura más alta, el término entropía de la ecuación ($T\Delta S$) es más negativo que el término entalpía, por lo que el cambio de energía libre es positivo y el proceso no puede ocurrir de modo espontáneo. A 0°C el sistema está en equilibrio; a −10°C se favorece el proceso de solidificación, esto es, ΔG es negativa.

Cuadro 3-1 Termodinámica de la transformación hielo-agua

Temp. (°C)	ΔE (cal/mol)	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/mol · °C)	$T\Delta S$ (cal/mol)	ΔG (cal/mol)
−10	−1 343	−1 343	−4.9	−1 292	−51
0	−1 436	−1 436	−5.2	−1 436	0
+10	−1 529	−1 529	−5.6	−1 583	+54

Fuente: I. M. Klotz, *Energy in biochemical reactions,* Academic Press, 1967.

Cambios de energía libre en las reacciones químicas

Luego de describir el concepto de energía libre en términos generales es posible aplicar la información a las reacciones químicas dentro de la célula. Todas las reacciones químicas que tienen lugar allí son reversibles, y por lo tanto, debe considerarse que dos reacciones ocurren al mismo tiempo, una en un sentido y otra en el sentido inverso. De acuerdo con la ley de acción de masa, la velocidad de una reacción es proporcional a la concentración de los reactivos. Considérese, por ejemplo, la siguiente reacción hipotética:

$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

La velocidad de la reacción es directamente proporcional al producto de las concentraciones molares de A y B. La velocidad de la reacción puede expresarse como $k_1[A][B]$, donde k_1 es una constante de velocidad para la reacción. La velocidad de la reacción inversa es $k_2[C][D]$. Sin embargo, todas las reacciones químicas proceden despacio hacia un estado de equilibrio, es decir, hacia el punto en el que las velocidades de las reacciones en uno y otro sentidos sean iguales. En equilibrio, la misma cantidad de moléculas de A y B se convierte en moléculas de C y D por unidad de tiempo, conforme se integran a partir de ellas. Por consiguiente, en equilibrio

$$k_1[A][B] = k_2[C][D]$$

que puede arreglarse como sigue:

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

En otras palabras, en equilibrio hay una proporción predecible entre la concentración de productos y la concentración de reactivos. Este índice, que es igual a k_1/k_2, se denomina **constante de equilibrio K_{eq}**.

La constante de equilibrio permite predecir la dirección (directa o inversa) en la que se favorece la reacción en unas condiciones determinadas. Por ejemplo, supóngase que se estudia la reacción previa y se acaban de mezclar los cuatro componentes (A, B, C, D) de manera que la concentración inicial de cada uno es 0.5 molar (M).

$$\frac{[C][D]}{[A][B]} = \frac{[0.5][0.5]}{[0.5][0.5]} = 1$$

La dirección en la que procede esta reacción depende de la constante de equilibrio. Si la K_{eq} es mayor de 1, la reacción procede a una mayor velocidad hacia la formación de los productos C

y D que en sentido contrario. Por ejemplo, si la K_{eq} es 9.0, las concentraciones de los reactivos y los productos en equilibrio en esta mezcla particular de reacción son 0.25 y 0.75 M, respectivamente.

$$\frac{[C][D]}{[A][B]} = \frac{[0.75][0.75]}{[0.25][0.25]} = 9$$

Por el otro lado, si K_{eq} es menor de 1, la reacción inversa procede a mayor velocidad que la reacción directa, por lo que la concentración de A y B se eleva a expensas de C y D. Con base en estos puntos puede deducirse que la dirección real en la que procede la reacción en cualquier momento depende de las concentraciones relativas de todas las moléculas participantes y puede predecirse si se conoce la K_{eq}.

Ahora volvamos al tema de la energética. La proporción entre los reactivos y los productos presentes en equilibrio depende de los niveles de energía libre relativa de los reactivos y los productos. Mientras la energía libre total de los reactivos sea mayor que la energía libre total de los productos, ΔG tiene un valor negativo y la reacción procede en el sentido de la formación de productos. Mientras mayor sea la ΔG, más se aleja la reacción del equilibrio y más trabajo puede realizarse en el sistema. A medida que avanza la reacción, disminuye la diferencia en el contenido de energía libre entre los reactivos y los productos (ΔG se vuelve menos negativa), hasta que en el equilibrio la diferencia es cero ($\Delta G = 0$) y no se puede obtener más trabajo.

Como la ΔG para una reacción determinada depende de la mezcla de reacción presente en cierto momento, no es un término útil para comparar la energética de varias reacciones. Para colocar las reacciones en una base comparable y poder hacer varios tipos de cálculos se adoptó una convención para considerar el cambio de energía libre que ocurre durante una reacción en un conjunto de *condiciones estándar*. Para las reacciones bioquímicas, las condiciones se establecieron de manera arbitraria en 25°C (298 K) y una atmósfera de presión, con todos los reactivos y productos presentes en concentración 1.0 M, excepto el agua, que está presente en 55.6 M y el hidrógeno (H^+) a 10^{-7} M (pH 7.0).[2] El **cambio de energía libre estándar ($\Delta G°'$)** describe la energía libre suscitada cuando los reactantes se convierten en productos en estas condiciones estándar. Debe tenerse presente que las condiciones estándar no prevalecen en la célula, por lo que hay que tener precaución cuando se usen valores de las diferencias de energía libre estándar en los cálculos de energética celular.

La relación entre la constante de equilibrio y el cambio estándar en la energía libre se presenta con la ecuación

$$\Delta G°' = -RT \ln K'_{eq}$$

Cuando el logaritmo natural (ln) se convierte en logaritmo de base 10 ($\log_{10}$), la ecuación se convierte en

$$\Delta G°' = -2.303RT \log K'_{eq}$$

[2] $\Delta G°'$ indica que las condiciones estándar incluyen pH 7, mientras que $\Delta G°$ se refiere a condiciones estándar en H^+ 1.0 M (pH 0.0). La designación de K'_{eq} también indica una mezcla de reacción con pH 7.

Cuadro 3-2 Relación entre $\Delta G°'$ y K'_{eq} a 25°C

K'_{eq}	$\Delta G°'$ (kcal/mol)
10^6	−8.2
10^4	−5.5
10^2	−2.7
10^1	−1.4
10^0	0.0
10^{-1}	1.4
10^{-2}	2.7
10^{-4}	5.5
10^{-6}	8.2
10^{-6}	8.2

donde R es la constante de gas (1.987 cal/mol · K) y T es la temperatura absoluta (298 K).[3] Hay que recordar que el log de 1.0 es cero. Por consiguiente, de la ecuación previa se deduce que las reacciones que tienen constantes de equilibrio mayores de 1.0 tienen valores de $\Delta G°'$ negativos, lo cual indica que pueden ocurrir en forma espontánea en *condiciones estándar*. Las reacciones que tienen constantes de equilibrio menores de 1 poseen valores positivos de $\Delta G°'$ y no pueden ocurrir en forma espontánea en condiciones estándar. En otras palabras, dada la reacción $A + B \rightleftharpoons C + D$, si la $\Delta G°'$ es negativa, la reacción se desplaza a la derecha cuando todos los reactivos y productos estén en concentración 1.0 M a pH 7. Mientras mayor sea el valor negativo, la reacción procede más hacia la derecha antes de alcanzar el equilibrio. En las mismas condiciones, si la $\Delta G°'$ es positiva, la reacción procede a la izquierda, esto es, se favorece la reacción inversa. La relación entre $\Delta G°'$ y K'_{eq} se muestra en el cuadro 3-2.

Cambios de la energía libre en las reacciones metabólicas Una de las reacciones químicas más importantes en la célula es la hidrólisis del ATP (fig. 3-5). En la reacción

$$ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i$$

la diferencia en la energía libre estándar entre los productos y los reactivos es −7.3 kcal/mol. Con base en esta información, es evidente que en condiciones estándar la hidrólisis del ATP es una reacción muy favorable (exergónica), que tiende hacia una proporción alta [ADP]/[ATP] (difosfato de adenosina) en equilibrio. Existen muchas razones por las que esta reacción es tan favorable, una de las cuales es evidente en la figura 3-5. La repulsión electrostática que crean cuatro cargas negativas cercanas en ATP^{4-} se alivia en forma parcial por la formación de ADP^{3-}.

Es importante que la diferencia entre ΔG y $\Delta G°'$ se mantenga clara en la mente. La $\Delta G°'$ es un valor fijo para una reacción determinada e indica la dirección en la que procedería la reacción si el sistema está en condiciones estándar. Como las condiciones estándar no existen dentro de una célula, los valores de $\Delta G°'$ no pueden usarse para predecir la dirección en la que

[3] El lado derecho de esta ecuación es equivalente a la cantidad de energía libre que se pierde conforme la reacción procede de las condiciones estándar al equilibrio.

H_2O + Trifosfato de adenosina (ATP) $\xrightarrow{\Delta G^{\circ\prime} = -7.3 \text{ kcal/mol}}$ Difosfato de adenosina (ADP) + Fosfato inorgánico (P_i)

Adenina

Ribosa

Trifosfato

$\Delta G^{\circ\prime} = +7.3$ kcal/mol

FIGURA 3-5 Hidrólisis del ATP. El trifosfato de adenosina (ATP) se hidroliza como parte de muchos procesos bioquímicos. En la mayoría de las reacciones, como se muestra aquí, el ATP se hidroliza en ADP y fosfato inorgánico (P_i), pero en algunos casos (no se muestra) se hidroliza a AMP, un compuesto que sólo tiene un grupo fosfato, y pirofosfato (PP_i). Estas dos reacciones tienen la misma $\Delta G^{\circ\prime}$ de –7.3 kcal/mol (–30.5 kJ/mol).

procede una reacción particular en un momento determinado dentro de un compartimiento celular específico. Para hacerlo es preciso conocer la ΔG, que se consigue a partir de las concentraciones de los reactivos y productos presentes en ese momento. A 25°C

$$\Delta G = \Delta G^{\circ\prime} + 2.303RT\log\frac{[C][D]}{[A][B]}$$

$$\Delta G = \Delta G^{\circ\prime} + 2.303(1.987 \text{ cal/mol} \cdot \text{K})(298 \text{ K}) \log\frac{[C][D]}{[A][B]}$$

$$\Delta G = \Delta G^{\circ\prime} + (1.4 \text{ kcal/mol})\log\frac{[C][D]}{[A][B]}$$

donde [A], [B], [C] y [D] son las concentraciones reales en el momento. El cálculo de ΔG revela la dirección en la que procede la reacción en la célula y qué tan cerca está dicha reacción del equilibrio. Por ejemplo, las concentraciones celulares típicas de los reactivos y productos en la reacción para la hidrólisis del ATP podrían ser [ATP] = 10 mM; [ADP] = 1 mM; [P_i] = 10 mM. Si se sustituyen estos valores en la ecuación:

$$\Delta G = \Delta G^{\circ\prime} + 2.303\ RT\log\frac{[ADP][P_i]}{[ATP]}$$

$$\Delta G = -7.3 \text{ kcal/mol} + (1.4 \text{ kcal/mol})\log\frac{[10^{-3}][10^{-2}]}{[10^{-2}]}$$

$$\Delta G = -7.3 \text{ kcal/mol} + (1.4 \text{ kcal/mol})(-3)$$

$$\Delta G = -11.5 \text{ kcal/mol (o } -46.2 \text{ kJ/mol)}$$

Por lo tanto, aunque la $\Delta G^{\circ\prime}$ para la hidrólisis del ATP es –7.3 kcal/mol, la ΔG típica en la célula para esta reacción es cercana a –12 kcal/mol porque la célula mantiene un índice elevado de [ATP]/[ADP].

En las células se llevan a cabo muchas reacciones con valores positivos de $\Delta G^{\circ\prime}$ porque las concentraciones relativas de los reactivos y productos favorecen el proceso de las reacciones. Esto puede suceder de dos maneras. La primera ilustra la importante diferencia entre ΔG y $\Delta G^{\circ\prime}$ y la segunda revela la forma en que las reacciones con valores positivos de $\Delta G^{\circ\prime}$ pueden impulsarse en la célula por el ingreso de energía química almacenada.

Considérese la reacción de la glucólisis (véase fig. 3-24) en la que el fosfato de dihidroxiacetona se convierte en gliceraldehído 3-fosfato. La $\Delta G^{\circ\prime}$ para esta reacción es +1.8 kcal/mol y aun así en la célula se forma el producto de esta reacción. La reacción existe porque otras reacciones celulares mantienen la proporción entre reactantes y el producto por arriba del definido en la constante de equilibrio. Siempre que exista esta condición, la ΔG es negativa y la reacción continúa en forma espontánea en el sentido de la formación de gliceraldehído 3-fosfato. Esto muestra una característica relevante del metabolismo celular: las reacciones específicas no pueden considerarse de forma independiente como si ocurrieran en el aislamiento de un tubo de ensayo. Cientos de reacciones suceden de manera simultánea en la célula. Todas estas reacciones se interrelacionan porque el producto de una se convierte en el sustrato de la siguiente en la secuencia y así continúa en toda una vía metabólica y hacia la siguiente. Para mantener la producción de gliceraldehído 3-fosfato a expensas del fosfato de dihidroxiacetona, la reacción se sitúa dentro de una vía metabólica de tal forma que el producto se elimina por la siguiente reacción en la secuencia a un ritmo lo bastante rápido para mantener una proporción favorable en las concentraciones de estas dos moléculas.

Unión de reacciones endergónicas y exergónicas Las reacciones con valores positivos altos de $\Delta G^{\circ\prime}$ casi siempre se impulsan por el ingreso de energía. Considérese la formación del aminoácido glutamina a partir de ácido glutámico por acción de la enzima sintetasa de glutamina:

$$\text{Ácido glutámico} + NH_3 \rightarrow \text{glutamina} \qquad \Delta G^{\circ\prime} = +3.4 \text{ kcal/mol}$$

Esta reacción endergónica sucede en la célula porque el ácido glutámico se convierte en realidad en glutamina en dos reacciones en secuencia, ambas exergónicas:

primera reacción: ácido glutámico + ATP →
fosfato de glutamilo + ADP
segunda reacción: fosfato de glutamilo + NH_3 →
glutamina + P_i

Reacción total: ácido glutámico + ATP + NH_3 →
glutamina + ADP + P_i
$\Delta G^{\circ\prime} = -3.9$ kcal/mol

Se dice que la formación de glutamina se da cuando se *une* a la hidrólisis del ATP. Siempre que la ΔG para la hidrólisis del ATP sea más negativa que lo positiva que es la ΔG para la síntesis de glutamina a partir de ácido glutámico, la reacción de hidrólisis del ATP "colina abajo" puede usarse para impulsar la síntesis "colina arriba" de la glutamina. Para unir las dos reacciones químicas, el producto de la primera reacción se convierte en el sustrato de la segunda. El puente entre ambas reacciones, el fosfato de glutamilo en este caso, se llama *intermediario común*. En esencia, lo que sucede es que la hidrólisis exergónica del ATP se produce en dos pasos. En el primer paso, el ácido glutámico funciona como receptor del grupo fosfato, que se desplaza por el NH_3 en el segundo paso.

La hidrólisis del ATP puede usarse en la célula para impulsar reacciones que conducen a la formación de moléculas como la glutamina, porque los valores del ATP se mantienen en niveles mucho más altos (en relación con los del ADP) de lo que estarían en equilibrio. Esto puede demostrarse con el siguiente cálculo. Como se mencionó antes, la concentración celular típica del P_i sería 10 mM. Para calcular el índice de equilibrio de [ATP]/[ADP] en estas condiciones se puede ajustar la ΔG en el valor de equilibrio de cero y resolver la ecuación siguiente (tomada de la página 91) para [ADP]/[ATP]:

$$\Delta G = \Delta G^{\circ\prime} + (1.4 \text{ kcal/mol}) \log \frac{[\text{ADP}][\text{P}_i]}{[\text{ATP}]}$$

$$0 = -7.3 \text{ kcal/mol} + (1.4 \text{ kcal/mol}) \log \frac{[\text{ADP}][10^{-2}]}{[\text{ATP}]}$$

$$0 = -7.3 \text{ kcal/mol} + (1.4 \text{ kcal/mol})\left(\log 10^{-2} + \log \frac{[\text{ADP}]}{[\text{ATP}]}\right)$$

$$+\,7.3 \text{ kcal/mol} = (1.4 \text{ kcal/mol})(-2) + (1.4 \text{ kcal/mol}) \log \frac{[\text{ADP}]}{[\text{ATP}]}$$

$$\log \frac{[\text{ADP}]}{[\text{ATP}]} = \frac{10.1 \text{ kcal/mol}}{1.4 \text{ kcal/mol}} = 7.2$$

$$\frac{[\text{ADP}]}{[\text{ATP}]} = 1.6 \times 10^{7}$$

Por tanto, en equilibrio, se esperaría que la concentración del ADP fuera más de 10^7 veces la del ATP, pero de hecho las concentraciones de ATP en la mayoría de las células son 10 a 100 veces mayores a las del ADP. Éste es un punto crucial, ya que son las concentraciones relativas de ATP y ADP lo que importa.

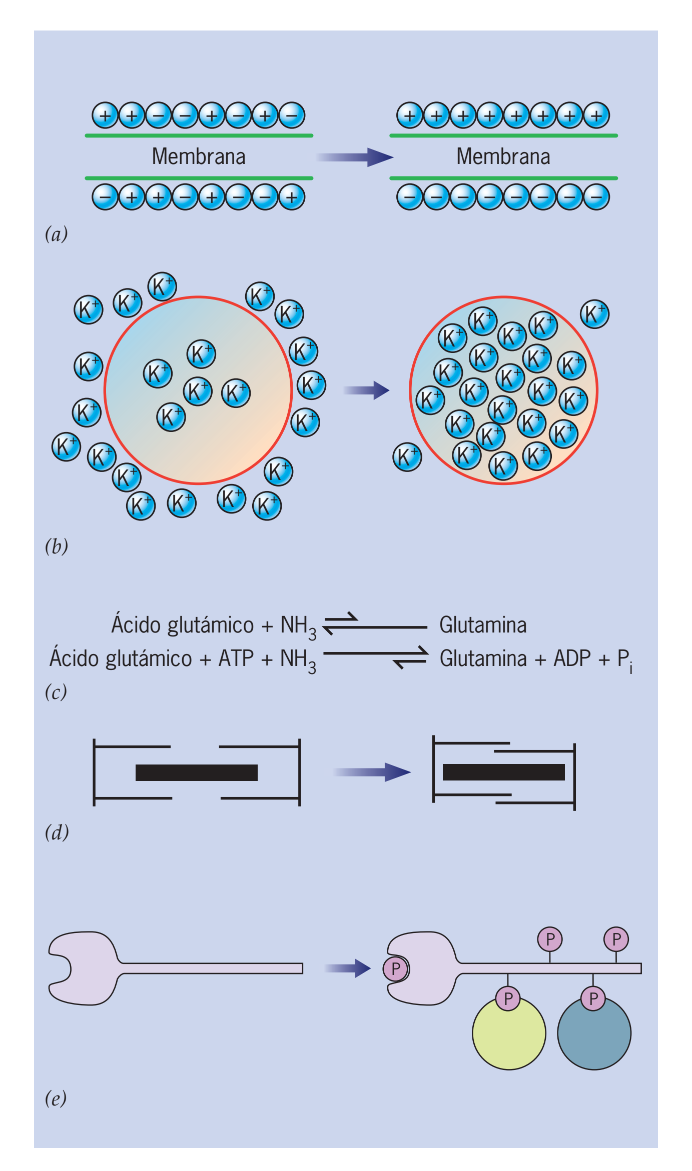


FIGURA 3-6 Unas cuantas funciones de la hidrólisis del ATP. En la célula, el ATP puede usarse para: *a*) separar una carga a través de una membrana; *b*) concentrar un soluto particular dentro de la célula; *c*) impulsar una reacción química desfavorable; *d*) deslizar filamentos unos sobre otros, como sucede durante el acortamiento de una célula muscular, y *e*) donar un grupo fosfato a una proteína, con lo cual cambia sus propiedades e induce una respuesta deseada. En este caso los grupos fosfato donados sirven como sitios de unión para otras proteínas.

Si una célula contuviera una mezcla equilibrada de ATP, ADP y P_i, no importaría cuánto ATP hubiera, la célula nunca tendría la capacidad para realizar trabajo.

La hidrólisis del ATP se usa para impulsar la mayoría de los procesos endergónicos dentro de la célula, entre ellos las reacciones químicas como la que se acaba de describir, la separación de carga a través de la membrana, la concentración de un soluto, el movimiento de los filamentos en una célula muscular y las propiedades de las proteínas (fig. 3-6). El ATP puede usarse para procesos tan diversos porque su grupo fosfato terminal puede transferirse a diversos tipos de moléculas, incluidos aminoácidos, azúcares, lípidos y proteínas. En la mayoría de las reacciones

vinculadas, el grupo fosfato se transfiere en un paso inicial de ATP a uno de estos aceptores y luego se elimina en un segundo paso (véase la figura 4-45 como ejemplo).

Equilibrio contra metabolismo en estado estable A medida que las reacciones tienden hacia el equilibrio, la energía libre disponible para hacer el trabajo disminuye hacia un mínimo y la entropía aumenta hacia un máximo. Por lo tanto, mientras más lejos se mantenga una reacción de este estado de equilibrio, mayor será su capacidad para efectuar trabajo y aumentar su entropía. En esencia, el metabolismo celular es un metabolismo alejado del equilibrio; esto es, se caracteriza por índices fuera de equilibrio entre los reactivos y los productos. Esto no significa que algunas reacciones no ocurran en o cerca del equilibrio dentro de las células. De hecho, muchas de las reacciones de una vía metabólica pueden estar cerca del equilibrio (véase fig. 3-25). Sin embargo, por lo menos una y a menudo varias reacciones en una vía están lejos del equilibrio, lo que las hace irreversibles. Éstas son las reacciones que mantienen el proceso de la vía en un solo sentido. También hay reacciones sujetas a la regulación celular porque el flujo de materiales a través de la vía completa puede aumentarse o disminuirse en gran proporción mediante la estimulación o inhibición de la actividad de enzimas que catalizan estas reacciones.

Los principios básicos de la termodinámica se formularon con sistemas no vivos, *cerrados* (sin intercambio de materia entre el sistema y su ambiente) en condiciones de equilibrio reversibles. Las características únicas del metabolismo celular requieren una perspectiva diferente. El metabolismo celular puede mantenerse a sí mismo en condiciones irreversibles de desequilibrio porque, a diferencia del ambiente dentro de un tubo de ensayo, la célula es un sistema *abierto*. Los materiales y la energía fluyen en forma continua hacia la célula desde la corriente sanguínea o el medio de cultivo. La magnitud de este ingreso a las células desde el exterior se vuelve aparente si tan sólo se suspende la respiración. Las personas dependen minuto a minuto de una fuente externa de oxígeno porque el oxígeno es un reactivo muy importante en el metabolismo celular. El flujo continuo de oxígeno y otros materiales hacia dentro y fuera de las células permite la existencia del metabolismo celular en un **estado estable** (fig. 3-7). En un estado estable, las concentraciones de los reactivos y productos permanecen relativamente constantes, aun cuando las reacciones individuales no siempre estén en equilibrio. Esto no equivale a sugerir que las concentraciones de metabolitos celulares no cambien. Las células son capaces de ajustar continuamente la concentración de sustancias clave en respuesta a situaciones cambiantes. Por ejemplo, un ascenso o descenso de la concentración de sustancias reguladoras, como la hormona insulina, puede causar un enorme aumento o decremento en la producción de azúcares, aminoácidos o grasas. En otras palabras, las células existen en un estado de desequilibrio *dinámico*, en el cual las velocidades de las reacciones a la derecha y a la izquierda pueden aumentar o disminuir de manera instantánea en respuesta a condiciones cambiantes.

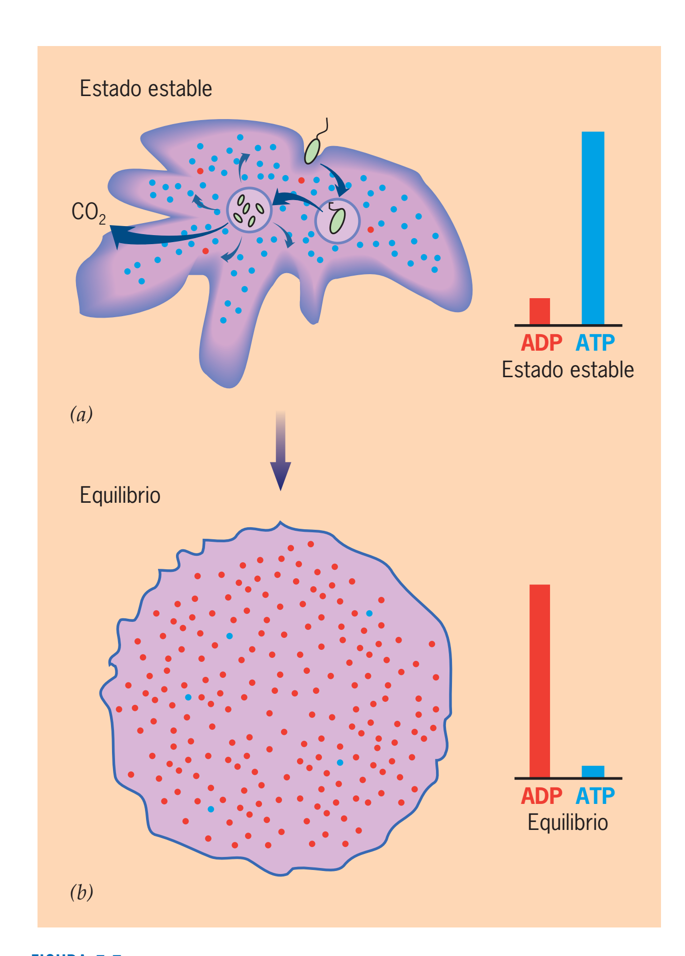


FIGURA 3-7 Estado estable contra equilibrio. *a*) Siempre que esta ameba continúe con la captación de nutrimentos del mundo exterior, puede obtener la energía necesaria para mantener las concentraciones de compuestos en estado estable, lo cual está muy lejos del equilibrio. Las concentraciones de ATP y ADP en el estado estable están indicadas por los puntos de color y el histograma. *b*) Cuando la ameba muere, las concentraciones de ATP y ADP (así como de otros compuestos bioquímicos) cambian hacia sus índices de equilibrio.

REVISIÓN ?

1. Describa las diferencias entre la primera y la segunda leyes de la termodinámica y la forma en que, cuando se consideran juntas, pueden describir la dirección de los fenómenos que ocurren en el universo.
2. ¿De qué manera el mantenimiento del estado vivo ordenado es consistente con la segunda ley de la termodinámica?
3. Describa dos ejemplos en los que disminuya la entropía de un sistema y dos ejemplos en los que aumente la entropía de un sistema.
4. Explique las diferencias entre ΔG y $\Delta G^{\circ\prime}$; entre las velocidades relativas de las reacciones directa e inversa cuando ΔG es negativa, cero o positiva. ¿Cuál es la relación entre $\Delta G^{\circ\prime}$ y K'_{eq}?, ¿cómo puede una célula llevar a cabo una reacción que tiene una $\Delta G^{\circ\prime}$ positiva?
5. ¿Cómo es posible que una célula mantenga un índice [ATP]/[ADP] mayor de uno?, ¿en qué difiere esta proporción de la esperada en equilibrio?
6. ¿Cómo es que la formación del hielo no sucede a temperaturas inferiores a 0°C?

3.2 ENZIMAS COMO CATALIZADORES BIOLÓGICOS

Al final del siglo XIX había un feroz debate acerca de si el proceso de formación de etanol requería o no la presencia de células intactas de levadura. En un lado del debate estaba el especialista en química orgánica Justus von Liebig, quien argumentaba que las reacciones de fermentación que producían el alcohol no eran distintas de otros tipos de reacciones orgánicas que se habían estudiado en el tubo de ensayo. En el otro lado estaba el biólogo Louis Pasteur, que aducía que el proceso de fermentación sólo podía ocurrir dentro de los confines de la célula intacta, viva y muy organizada.

En 1897, dos años después de la muerte de Pasteur, Hans Büchner, un bacteriólogo, y su hermano Eduard, un químico, prepararon "jugo de levadura", un extracto que obtuvieron al moler células de levaduras con granos de arena para luego tamizar la mezcla con papel filtro. Querían conservar el jugo de levaduras para usarlo más tarde. Después de mantener el extracto con antisépticos y fallar, intentaron proteger la preparación para que no se alterara mediante la adición de azúcar, el mismo procedimiento empleado para conservar mermeladas y jaleas. En lugar de conservar la solución, el jugo de levaduras produjo gas a partir del azúcar y emitió burbujas en forma continua durante días. Después de más análisis, Eduard descubrió que la fermentación producía alcohol y burbujas de dióxido de carbono. Büchner había demostrado que la fermentación no requería la presencia de células intactas.

Sin embargo, pronto se descubrió que la fermentación era muy diferente a los tipos de reacciones que llevaban a cabo los expertos en química orgánica. La fermentación necesitaba la presencia de un conjunto único de catalizadores que no tenían contraparte en el mundo inanimado. Estos catalizadores se llamaron **enzimas** (de términos griegos que significan "en levaduras"). Las enzimas son los mediadores del metabolismo, encargados de todas las reacciones que ocurren en una célula. Sin las enzimas, las reacciones metabólicas se producirían con tanta lentitud que serían imperceptibles.

La primera evidencia de que las enzimas son proteínas la obtuvo James Sumner de la *Cornell University* en 1926, cuando cristalizó la enzima ureasa a partir de las semillas de *Canavalia ensiformis* e identificó su composición. Aunque en ese momento este hallazgo no se recibió con mucho entusiasmo, pronto se demostró que varias enzimas más son proteínas y en unos cuantos decenios se aceptó que todos los catalizadores biológicos eran proteínas. Sin embargo, hace poco resultó evidente que los catalizadores de ciertas reacciones biológicas son moléculas de RNA (ácido ribonucleico). En favor de la claridad, el término "enzima" se reserva en general para los catalizadores proteicos, mientras que el término "ribozima" se emplea para los catalizadores del RNA. La descripción de este capítulo se limita a los catalizadores proteicos; en el capítulo 11 se describen las propiedades de los catalizadores del RNA.

Aunque las enzimas son proteínas, muchas de ellas son proteínas conjugadas, esto es, contienen componentes no proteicos llamados **cofactores**, que pueden ser inorgánicos (metales) u orgánicos (**coenzimas**). Cuando están presentes, los cofactores son participantes importantes en el funcionamiento de la enzima y a menudo realizan actividades para las que los aminoácidos no son adecuados. Por ejemplo, como se describió en el capítulo previo, en la mioglobina el átomo de hierro de un grupo hemo es el sitio en el que se une y almacena el oxígeno hasta que se requiere en el metabolismo celular.

Las propiedades de las enzimas

Como sucede con todos los catalizadores, las enzimas tienen las siguientes propiedades: a) sólo se precisan en pequeñas cantidades; b) no sufren cambios irreversibles durante la reacción, por lo que cada molécula de enzima puede participar de manera repetida en reacciones individuales, y c) no tienen efecto en la termodinámica de la reacción. Este último punto es muy importante. Las enzimas no aportan energía para una reacción química, por lo que no determinan si una reacción es favorable (exergónica) o desfavorable (endergónica) desde el punto de vista termodinámico. De igual manera, las enzimas tampoco establecen las proporciones entre productos y reactivos en equilibrio. Estas son propiedades inherentes de las sustancias químicas que participan en reacciones. Como catalizadores, las enzimas sólo pueden acelerar la velocidad a la que procede una reacción química favorable.

No es necesario que haya una relación entre la magnitud de la ΔG para una reacción particular y la velocidad con la que se produce esa reacción. La magnitud de ΔG sólo informa sobre la diferencia en la energía libre entre el estado inicial y el equilibrio. Mantiene una independencia total de la vía o el tiempo que se requiere para alcanzar el equilibrio. Por ejemplo, la oxidación de la glucosa es un proceso muy favorable, como puede verse por la cantidad de energía liberada durante su combustión. Sin embargo, los cristales de glucosa pueden dejarse expuestos al aire ambiental por tiempo indefinido sin que se conviertan en materiales menos energéticos. En otras palabras, la glucosa es *cinéticamente* estable, aun cuando sea inestable en sentido *termodinámico*. Incluso si el azúcar se disolviera, mientras la solución se mantenga estéril no se deteriora con rapidez. Empero, si se agregan unas cuantas bacterias, en poco tiempo las bacterias captarían el azúcar y la degradarían por medios enzimáticos.

Las enzimas son catalizadores muy eficientes. Los catalizadores que emplean los químicos orgánicos en el laboratorio, como el ácido, platino metálico y magnesio, casi siempre aceleran las reacciones 100 a 1 000 veces respecto de la velocidad sin catalizador. En cambio, por lo general las enzimas incrementan la velocidad de una reacción 10^8 a 10^{13} veces (cuadro 3-3). Con base en estas cifras, las enzimas pueden hacer en un segundo lo que tardaría tres a 300 mil años si no las hubiera. Un hecho aún más notable es que realizan esta hazaña a temperatura ambiente y en el pH del interior de la célula. Además, a diferencia de los catalizadores inorgánicos que emplean los químicos, las enzimas son muy específicas en relación con los reactivos a los que se unen y la reacción que catalizan. Los reactivos unidos con una enzima se llaman **sustratos**. Si, por ejemplo, la enzima hexocinasa está presente en solución con un ciento de compuestos de bajo peso molecular además de su sustrato, la glucosa, la enzima sólo reconocería las moléculas de glucosa y realizaría la reacción. Para fines prácticos, los otros compuestos podrían estar ausentes. Este tipo de especificidad, ya sea entre enzimas y sustratos u otros tipos de proteínas y las sustancias con las que se unen, es crucial para mantener el orden necesario para conservar la vida.

Cuadro 3-3. Actividad catalítica de diversas enzimas

Enzima	$t_{1/2}$ no enzimático[1]		Número de recambio[2]	Aumento de velocidad[3]
Descarboxilasa de OMP	78 000 000	años	39	1.4×10^{17}
Nucleasa estafilocócica	130 000	años	95	5.6×10^{14}
Desaminasa de adenosina	120	años	370	2.1×10^{12}
Nucleosidasa de AMP	69 000	años	60	6.0×10^{12}
Desaminasa de citidina	69	años	299	1.2×10^{12}
Fosfotriesterasa	2.9	años	2 100	2.8×10^{11}
Carboxipeptidasa A	7.3	años	578	1.9×10^{11}
Isomerasa de cetoesteroides	7	semanas	66 000	3.9×10^{11}
Isomerasa de triosafosfato	1.9	días	4 300	1.0×10^{9}
Mutasa de corismato	7.4	horas	50	1.9×10^{6}
Anhidrasa carbónica	5	segundos	1×10^{6}	7.7×10^{6}
Ciclofilina humana	23	segundos	13 000	4.6×10^{5}

Fuente: A. Radzicka y R. Wolfenden, *Science* 267:91, 1995. Copyright 1995, *American Association for the Advancement of Science.*

[1] El tiempo que pasaría para que la mitad de los reactivos se convirtiera en producto en ausencia de la enzima.

[2] El número de reacciones catalizadas por una sola molécula de enzima por segundo cuando opera con concentraciones saturadas de sustrato.

[3] El aumento de la velocidad de reacción logrado por la catálisis de la enzima en comparación con la reacción no catalizada.

Además de su alto nivel de actividad y especificidad, las enzimas actúan como directoras del tránsito metabólico en el sentido de que las reacciones catalizadas por las enzimas son muy ordenadas, los únicos productos que se forman son los apropiados. Esto es muy importante porque la formación de productos químicos intermedios afectaría muy pronto la vida de una célula frágil. Por último, a diferencia de otros catalizadores, la actividad de las enzimas puede regularse para cubrir las necesidades particulares de la célula en un momento determinado. Como resulta evidente en este capítulo y el resto del libro, las enzimas de una célula constituyen en realidad una colección prodigiosa de máquinas moleculares en miniatura.

Superación de la barrera de la energía de activación

¿Cómo es que las enzimas son capaces de realizar una catálisis tan efectiva? La primera pregunta a considerar es ¿por qué las reacciones favorables desde el punto de vista termodinámico no proceden por sí mismas a una velocidad relativamente alta en ausencia de las enzimas? Incluso el ATP, cuya hidrólisis es tan favorable, permanece estable en la célula hasta que se degrada en una reacción enzimática controlada. Si esto no fuera así, el ATP sería de poca utilidad en la célula.

Las transformaciones químicas requieren la rotura de ciertos enlaces covalentes dentro de los reactivos. Para que esto ocurra, los reactivos deben contener suficiente energía cinética (energía en movimiento) para superar una barrera conocida como **energía de activación (E_A)**. En la figura 3-8 se muestra en forma esquemática (la energía de activación

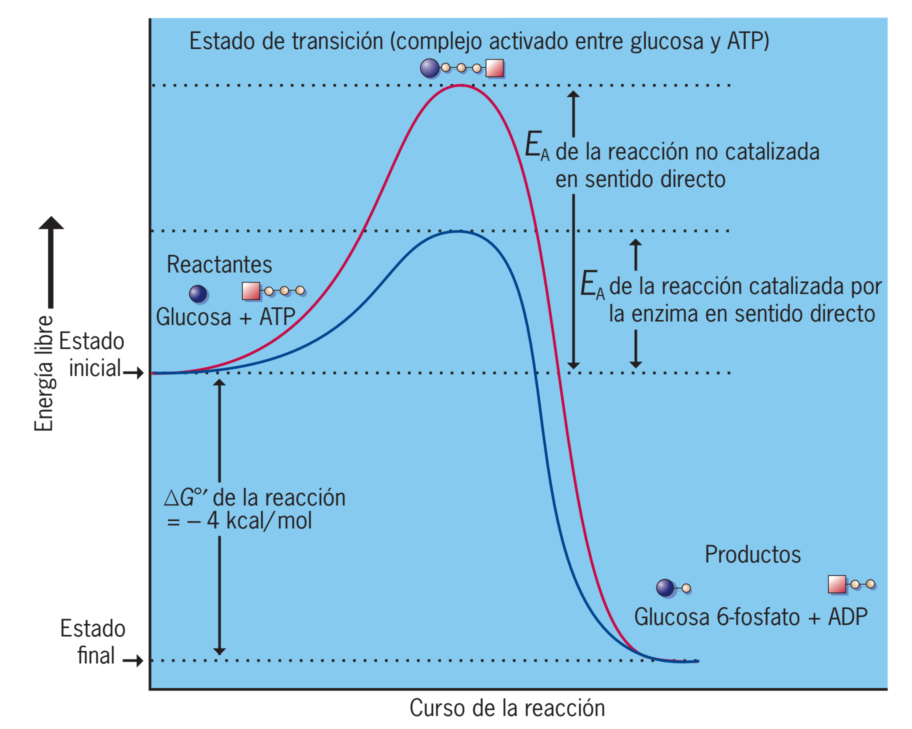


FIGURA 3-8 Energía de activación y reacciones enzimáticas. Aunque la formación de glucosa 6-fosfato es una reacción favorecida desde el punto de vista termodinámico ($\Delta G^{\circ\prime} = -4$ kcal/mol), los reactivos deben tener suficiente energía para alcanzar un estado activado en el que puedan ocurrir los reajustes atómicos necesarios para que se produzca la reacción. La cantidad de energía necesaria se llama energía de activación (E_A) y se representa por la altura de la curva. La energía de activación no es un valor fijo, sino que varía con la vía de la reacción particular. La E_A disminuye en gran proporción cuando los reactivos se combinan con un catalizador enzimático. (Este diagrama muestra un mecanismo de reacción sencillo de un solo paso. Muchas reacciones enzimáticas ocurren en dos o más pasos, lo que conduce a la formación de intermediarios [como en la figura 3-13]. Cada paso de la reacción tiene una E_A distinta y un estado de transición separado.)

se representa por la altura de las curvas). Los reactivos de una reacción química se comparan a menudo con un objeto en reposo en la cima de un acantilado, a punto de precipitarse al fondo. Si se deja intacto, lo más probable es que el objeto permanezca ahí por tiempo indefinido. Sin embargo, si alguien pasara e infundiera al objeto la energía suficiente para vencer la fricción u otra pequeña barrera en su camino e hiciera que el objeto llegara al borde del acantilado, caería en forma espontánea hasta el fondo. El objeto tiene el potencial para caer a un estado de menor energía una vez que se eliminan las barreras cinéticas.

En una solución a temperatura ambiente existen moléculas en un estado de movimiento aleatorio, cada una con cierta cantidad de energía cinética en un instante determinado. Entre una población de moléculas, su energía se distribuye en una curva con forma de campana (fig. 3-9), algunas con muy poca energía y otras con mucha más. Las moléculas con alta energía (moléculas activadas) permanecen como tales sólo por un corto tiempo y liberan su exceso de energía a otras moléculas por la colisión. Considérese una reacción en la que una molécula reactiva se divide en dos moléculas de producto. Si una determinada molécula reactiva adquiere suficiente energía para vencer la barrera de activación, existe la posibilidad de que se divida en dos moléculas de producto. La velocidad de la reacción depende del número de moléculas reactivas que contienen la energía cinética necesaria en cualquier momento específico. Una manera de aumentar esta velocidad de reacción consiste en incrementar la energía de los reactivos. La forma más fácil de hacerlo en el laboratorio es mediante el calentamiento de la mezcla de reacción (fig. 3-9). En cambio, la aplicación de calor a una reacción mediada por enzimas conduce a la desactivación rápida de la enzima por desnaturalización.

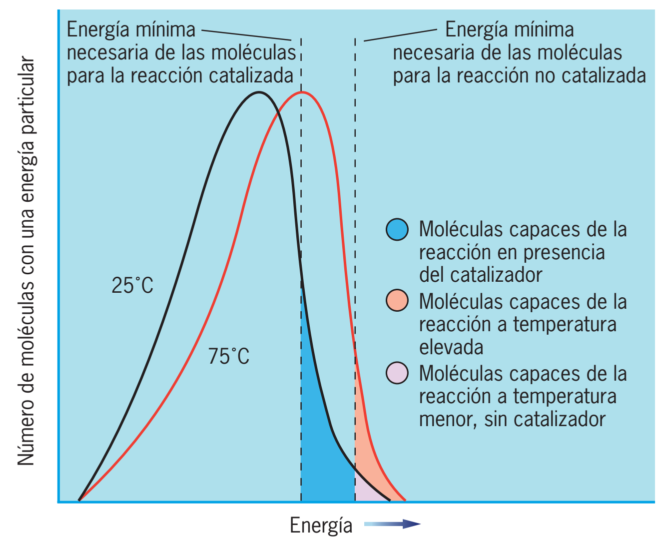


FIGURA 3-9 El efecto del descenso de la energía de activación en la velocidad de la reacción. Las curvas con forma de campana indican el contenido de energía de una población de moléculas presentes en una mezcla de reacción con dos temperaturas diferentes. El número de moléculas reactivas que contienen suficiente energía para presentar la reacción aumenta con el calentamiento de la mezcla o la adición de un catalizador enzimático. El calor incrementa la velocidad de reacción porque aumenta el contenido de energía de las moléculas, mientras que la enzima lo hace porque decrece la energía de activación necesaria para que se produzca la reacción.

Cuando los reactivos están en la cima de la cresta de energía y listos para convertirse en productos, se dice que están en **estado de transición** (fig. 3-8). En este momento, los reactivos crearon ya un complejo activado efímero en el que se forman y rompen enlaces. Se puede ilustrar la naturaleza de una estructura en estado de transición si se examina la interconversión de los estereoisómeros D y L de la prolina, una reacción catalizada por la enzima bacteriana racemasa de prolina.

D-prolina ⇌ Estado de transición ⇌ L-prolina

Esta reacción procede en cualquiera de los sentidos mediante la pérdida de un protón del carbono alfa de la molécula de prolina. Como resultado, la estructura en estado de transición contiene un carbanión de carga negativa en el que los tres enlaces que se forman con el átomo de carbono están en el mismo plano.

Al contrario de la diferencia en la energía libre estándar para una reacción, la energía de activación necesaria para alcanzar el estado de transición no es un valor fijo, sino que varía con el mecanismo de reacción particular empleado. Las enzimas catalizan las reacciones mediante la reducción de la magnitud de la barrera de la energía de activación. Por consiguiente, a diferencia de la catálisis por calor, las enzimas hacen que sus sustratos estén muy reactivos sin que deban elevarse a niveles energéticos muy altos. La figura 3-9 muestra una comparación entre el porcentaje de moléculas capaces de participar en una reacción catalizada por enzima y la reacción no catalizada. Las enzimas son capaces de disminuir la energía de activación al unirse con más firmeza al estado de transición que los reactivos, lo cual estabiliza este complejo activado, con lo que disminuye su energía. La importancia del estado de transición puede demostrarse de muchas maneras. Por ejemplo:

- Los compuestos que simulan el estado de transición de una reacción tienden a ser inhibidores muy efectivos de esa reacción porque pueden unirse con mucha firmeza a la región catalítica de la enzima.
- En condiciones normales, los anticuerpos no se comportan como enzimas, sino que tan sólo se unen con gran afinidad a las moléculas. No obstante, los anticuerpos que se unen con un compuesto que simula el estado de transición para una reacción pueden actuar a menudo como enzimas y catalizar la degradación de ese compuesto.

Conforme el estado de transición se convierte en productos, decrece la afinidad de la enzima por las moléculas unidas y se expulsan los productos.

El sitio activo

Como catalizadores, las enzimas aceleran los procesos de rotura y formación de enlaces. Para realizar esta tarea, las enzimas participan de manera intensa en las actividades que ocurren

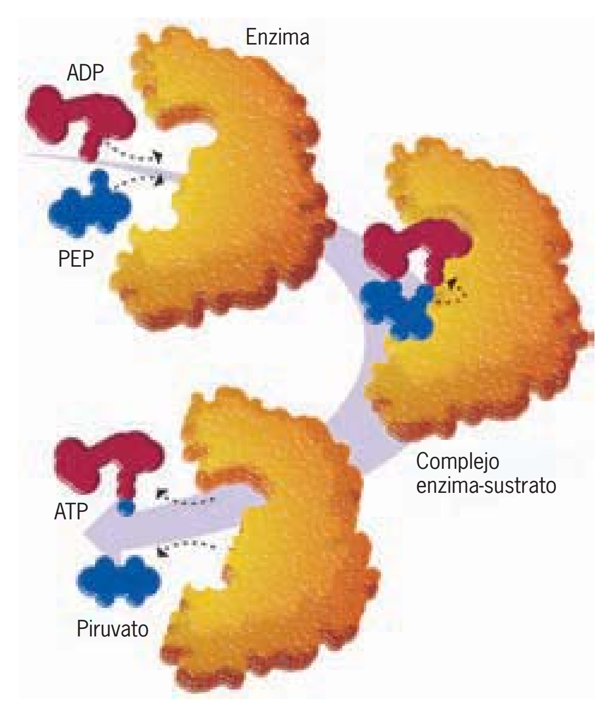


FIGURA 3-10 **Formación de un complejo enzima-sustrato.** Representación esquemática de la reacción que cataliza la cinasa de piruvato (véase fig. 3-24) en la que dos sustratos, el fosfoenolpiruvato (PEP) y el ADP, se unen con la enzima para formar un complejo enzima-sustrato (ES), que conduce a la formación de los productos, ATP y piruvato.

entre los reactantes. Esto lo hacen mediante la formación de un complejo con los reactivos, llamado **complejo enzima-sustrato (ES)**. En la figura 3-14 se presenta la imagen de un complejo ES y se le ilustra esquemáticamente en la figura 3-10. En la mayoría de los casos, la relación entre la enzima y el sustrato es no covalente, aunque se conocen muchos ejemplos en los que se forma un enlace covalente transitorio.

La parte de la molécula enzimática que participa de manera directa en la unión con el sustrato se llama **sitio activo**. El sitio activo y el (los) sustrato(s) tienen formas complementarias, lo que les permite unirse con un alto grado de precisión. La unión del sustrato con la enzima se realiza por algunos tipos de interacciones no covalentes (enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas) que determinan la estructura de la proteína misma. Por ejemplo, la enzima que se muestra en la figura 3-11*a* contiene varios residuos con carga positiva localizados en sitios estratégicos para unirse con átomos de carga negativa del sustrato. Además de unirse con el sustrato, el sitio activo contiene una disposición particular de cadenas laterales de aminoácidos que influyen en el sustrato y disminuyen la energía de activación para la reacción. La importancia de las cadenas laterales individuales del sitio activo puede valorarse mediante mutagénesis dirigida a un sitio (página 73), una técnica en la que un aminoácido particular se sustituye por otro con propiedades diferentes.

Por lo general, el sitio activo está sepultado en una hendidura o grieta que conduce del ambiente acuoso a las profundidades de la proteína. Cuando un sustrato entra a la hendidura del sitio activo, casi siempre libera sus moléculas de agua unidas (desolvación) y entra al ambiente hidrófobo dentro de la enzima. La reactividad de las cadenas laterales del sitio activo puede ser mucho mayor en este ambiente protegido que en el solvente acuoso de la célula. Los aminoácidos que conforman el sitio activo casi siempre se sitúan en puntos distantes a lo largo de la cadena polipeptídica extendida, pero se aproximan uno al otro cuando el polipéptido se pliega en su estructura terciaria final (fig. 3-11*b*, *c*). La estructura del sitio activo no sólo explica la actividad catalítica de la enzima, también su *especificidad*. Como se mencionó antes, la mayoría de las enzimas son capaces de unirse sólo con una o unas cuantas moléculas biológicas muy relacionadas.

Mecanismos de catálisis enzimática

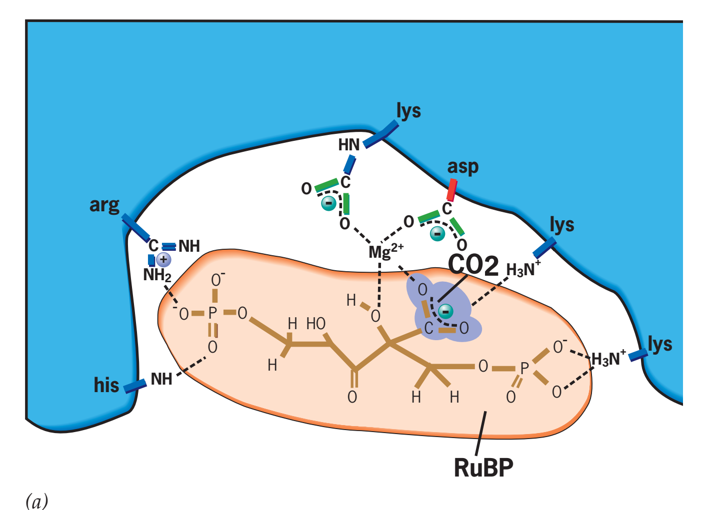
¿Cómo es que una enzima puede hacer que una reacción ocurra cientos de veces por segundo cuando la misma reacción podría tener lugar con una velocidad imperceptible en ausencia de la enzima? La respuesta radica en la formación del complejo enzima-sustrato que posibilita que el sustrato se extraiga de la solución y se mantenga en la superficie de una gran molécula catalizadora. Una vez ahí, las propiedades físicas y químicas del sustrato pueden modificarse de varias maneras, algunas de las cuales se describen en las secciones siguientes.

Orientación de sustrato Supóngase que se coloca un puñado de tuercas y tornillos en una bolsa y que luego ésta se sacude durante cinco minutos. Es muy improbable que cualquiera de los tornillos tuviera una tuerca bien ajustada en su extremo cuando se terminara el movimiento. En cambio, si se sujeta un tornillo en una mano y una tuerca en la otra, podría guiarse con rapidez el tornillo para entrar en la tuerca. Cuando se sujetan el tornillo y la tuerca en la orientación correcta, decrece en grado notorio la entropía del sistema. Las enzimas reducen la entropía de sus sustratos en forma similar.

Los sustratos unidos en la superficie de una enzima se aproximan mucho exactamente en la orientación correcta para producir la reacción (fig. 3-12*a*). En cambio, cuando los reactantes se encuentran en solución, están libres para realizar movimientos de traslación y rotación, e incluso los que tienen energía suficiente no siempre participan en una colisión que dé origen a la formación de un complejo en estado de transición.

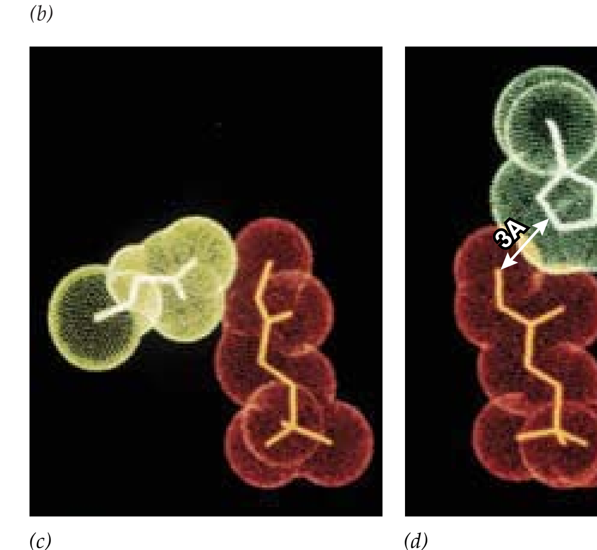
Cambio de la reactividad del sustrato Las enzimas están formadas por aminoácidos que tienen diferentes tipos de cadenas colaterales (grupos R), desde los que poseen cargas elevadas hasta los que son no polares. Cuando un sustrato se une con la superficie de una enzima, la distribución de electrones dentro de la molécula de sustrato recibe la influencia de las cadenas laterales contiguas de la enzima (fig. 3-12*b*). Esta influencia aumenta la reactividad del sustrato y estabiliza el complejo en estado de transición que se forma durante la reacción. Estos efectos se producen sin ingreso de energía externa, como calor.

Existen varios mecanismos generales por los que aumenta la reactividad de los sustratos por su vinculación con las enzimas. En términos sencillos, estos mecanismos son similares a los des-



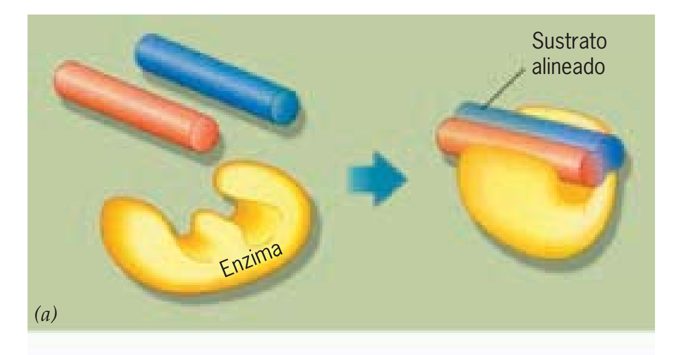
(a)

(b)

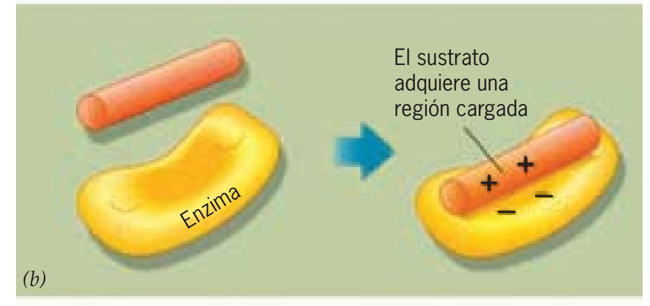


(c) (d)

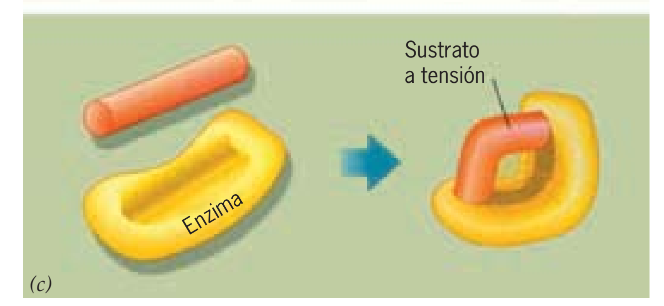
FIGURA 3-11 Sitio activo de una enzima. *a*) Representación esquemática del sitio activo de la enzima carboxilasa de difosfato de ribulosa que muestra los diversos sitios de interacción entre los sustratos unidos (RuBP y CO_2) y ciertas cadenas laterales de aminoácidos de la enzima. Además de determinar las propiedades de unión con el sustrato del sitio activo, estas interacciones no covalentes alteran las propiedades del sustrato de tal forma que acelera su conversión en los productos. *b*) Un mapa de densidad de electrones del sitio activo de una cinasa de timidina viral con el sustrato, desoxitimidina, mostrado en el centro del mapa (*flecha*). Los bordes de las rejillas dan una indicación de los alcances externos de los orbitales electrónicos de los átomos que constituyen el sustrato y las cadenas laterales de la enzima, lo que produce una representación visual del espacio que ocupan los átomos del sitio activo. *c*) y *d*) Ejemplos del ajuste preciso que ocurre entre las partes de una enzima y el sustrato durante la catálisis. Estos dos ejemplos muestran la estrecha relación espacial entre *c* un ácido glutámico (amarillo) y *d* una histidina (verde) de la enzima isomerasa de triosafosfato y el sustrato (rojo). (*A*, TOMADA DE D. A. HARRIS, BIOENERGETICS AT A GLANCE, P. 88, BLACKWELL, 1995; *B*, REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE D. G. BROWN, M. R. SANDERSON, ET AL., NATURE STR. BIOL 2:878, 1995; *C* Y *D*, REIMPRESAS CON AUTORIZACIÓN DE J. R. KNOWLES, NATURE 350:122, 1991; *B* Y *D*, COPYRIGHT 1995, 1991, MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)



(a)

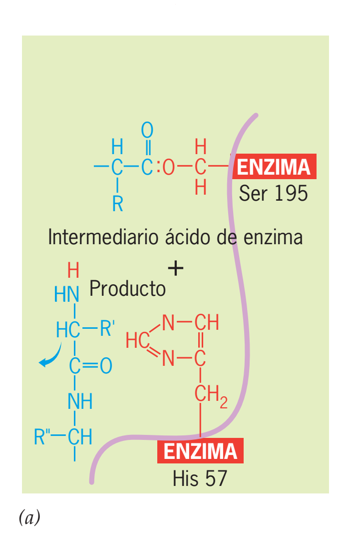


(b)



(c)

FIGURA 3-12 Tres mecanismos por los cuales las enzimas aceleran las reacciones: *a*) Mantienen la orientación precisa del sustrato. *b*) Cambian la reactividad del sustrato mediante la alteración de su estructura electrostática. *c*) Ejercen tensión física sobre los enlaces del sustrato que se van a romper.



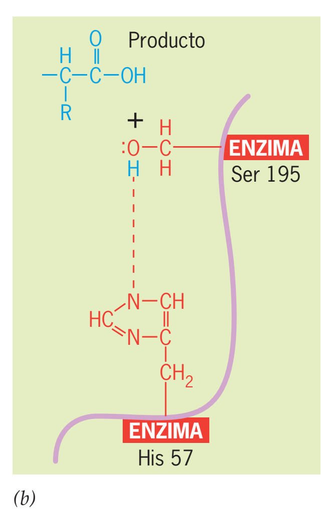


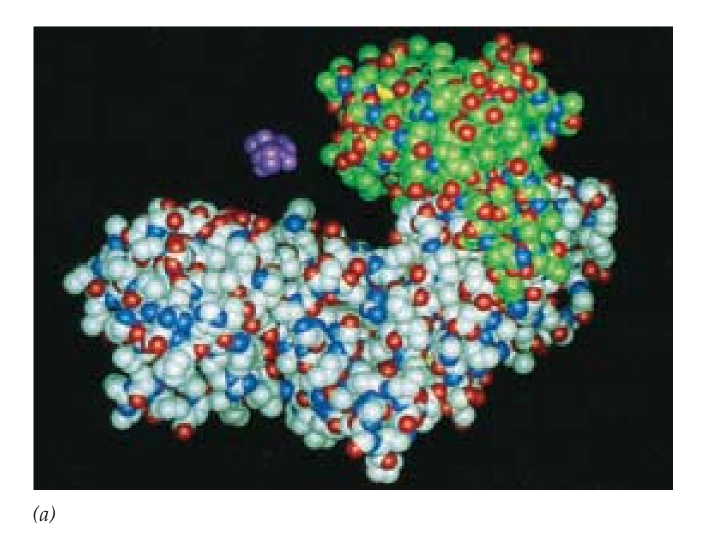
FIGURA 3-13 Representación esquemática del mecanismo catalítico de la quimotripsina. La reacción se divide en dos pasos. *a*) El átomo electronegativo de oxígeno de un residuo de serina (Ser 195) en la enzima, el cual tiene una carga negativa parcial, realiza un ataque nucleofílico sobre el átomo de carbono carbonilo del sustrato, que tiene una carga positiva parcial, lo cual separa el enlace peptídico. El sustrato polipeptídico se muestra en azul. La serina se vuelve más reactiva por un residuo de histidina cercano (His 57) que atrae al protón de la serina y luego dona el protón al átomo de nitrógeno del enlace peptídico separado. La histidina es capaz de hacerlo porque su cadena lateral es una base débil que puede ganar y perder un protón en el pH fisiológico. (Una base más fuerte, como la lisina, permanecería con todos sus protones en este pH.) Parte del sustrato forma un enlace covalente transitorio con la enzima mediante la cadena lateral de la serina, mientras se libera el resto del sustrato. (Puede notarse que los residuos de serina e histidina se sitúan a 138 aminoácidos de distancia en la secuencia primaria, pero se aproximan dentro de la enzima cuando se pliega el polipéptido. Un ácido aspártico, el residuo 102, que no se muestra, también participa en la catálisis mediante la influencia en el estado iónico de la histidina.) *b*) En el segundo paso, el átomo electronegativo del oxígeno de una molécula de agua se desplaza de la enzima al sustrato unido mediante un enlace covalente, con lo que se regenera la molécula de enzima libre. Como en el primer paso, la histidina participa en la transferencia de protones; en este paso, el protón se elimina del agua, lo que la convierte en un nucleófilo mucho más fuerte. Después, el protón se dona al residuo de serina de la enzima.

critos por los químicos orgánicos que estudian los mecanismos de las reacciones orgánicas en un tubo de ensayo. Por ejemplo, la velocidad de las reacciones puede modificarse de modo notorio con los cambios del pH. Aunque las enzimas no pueden cambiar el pH de su medio, contienen numerosos aminoácidos con cadenas laterales ácidas o básicas. Estos grupos son capaces de donar o aceptar protones del sustrato, lo que produce una alteración en el carácter electrostático del sustrato y lo vuelve más reactivo.

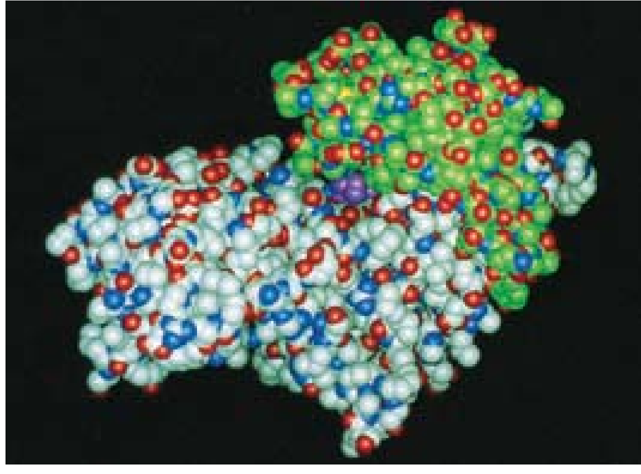
Los sitios activos de muchas enzimas contienen cadenas laterales con una carga positiva o negativa parcial. Estos grupos son capaces de reaccionar con un sustrato para producir un enlace covalente temporal entre la enzima y el sustrato. La quimotripsina, una enzima que digiere las proteínas de los alimentos dentro del intestino delgado, actúa de esta manera. La figura 3-13 muestra la serie de reacciones que ocurren cuando la quimotripsina hidroliza un enlace peptídico en una proteína sustrato. Tres aminoácidos dentro del sitio activo de la enzima, una serina, una histidina y un ácido aspártico, tienen un papel prominente. En la figura 3-13 la reacción se divide en dos pasos. En el primero, el átomo de oxígeno con carga eléctrica negativa de la cadena lateral de la serina de la enzima "ataca" a un átomo de carbono del sustrato. Como resultado, se hidroliza el enlace peptídico del sustrato y se forma un enlace covalente entre la serina y el sustrato, lo que desplaza al resto del sustrato como uno de los productos. Como se explica en el pie de la figura, la capacidad de la serina para llevar a cabo esta reacción depende del residuo de histidina cercano, el cual atrae al protón del grupo hidroxilo de la serina, lo que aumenta la potencia nucleofílica del átomo de oxígeno del grupo. Las enzimas también utilizan moléculas de agua con frecuencia en las reacciones que catalizan. En el segundo paso que se muestra en la figura 3-13*b*, el enlace covalente entre la enzima y el sustrato se divide por una molécula de agua, lo que devuelve a la enzima a su estado original libre y libera el resto del sustrato como el segundo producto.

Aunque las cadenas laterales de los aminoácidos pueden participar en diversas reacciones, no son muy aptas para donar o aceptar electrones. Como se ve en la sección siguiente (y con más detalle en los capítulos 5 y 6), la transferencia de electrones es el fenómeno central de las reacciones de oxidación-reducción que tienen un papel vital en el metabolismo celular. Para catalizar estas reacciones, las enzimas contienen cofactores (iones metálicos o coenzimas) que aumentan la reactividad de los sustratos mediante la eliminación o donación de electrones.

Inducción de tensión en el sustrato Aunque el sitio activo de una enzima puede ser complementario a su(s) sustrato(s), varios estudios revelan un cambio en las posiciones relativas de ciertos átomos de la enzima una vez que se une con el sustrato. En muchos casos, la conformación cambia de tal forma que mejora el ajuste complementario entre la enzima y los reactivos (un **ajuste inducido**) y los grupos reactivos apropiados de la enzima se colocan en su sitio. En la figura 3-14 se muestra un



(a)



(b)

FIGURA 3-14 Un ejemplo de ajuste inducido. Cuando una molécula de glucosa se une a la enzima hexocinasa, la proteína sufre un cambio en su conformación que rodea al sustrato dentro del saco activo. (Cortesía de Thomas A. Steitz.)

ejemplo de este tipo de ajuste inducido. Estos tipos de movimientos dentro de una molécula de enzima constituyen un buen ejemplo de acción de una proteína como máquina molecular. A medida que ocurren estos cambios conformacionales, se realiza trabajo mecánico, lo cual permite a la enzima ejercer una fuerza física en determinados enlaces de una molécula de sustrato. Esto tiene el efecto de desestabilizar el sustrato, lo cual hace que adopte el estado de transición en que se libera la tensión (fig. 3-12*c*).

Estudio de los cambios de la conformación e intermediarios catalíticos Para comprender por completo el mecanismo por el cual una enzima cataliza una reacción particular, es necesario describir los diversos cambios en la estructura atómica y electrónica que ocurren durante la reacción en la enzima y el sustrato. En el capítulo anterior se describió cómo las técnicas cristalográficas con rayos X pueden revelar detalles de la estructura de una molécula enzimática grande. Puesto que 40 a 60% del volumen de un cristal proteico típico consiste en solvente atrapado, la mayoría de las enzimas cristalizadas conserva un alto grado de actividad enzimática. Por lo tanto, sería posible usar técnicas de difracción de rayos X para estudiar los mecanismos de la reacción. Hay una limitación importante: el tiempo. En un estudio cristalográfico estándar, los cristales de la enzima deben someterse a un haz de rayos X por un lapso de horas o días mientras se reúnen los datos necesarios. La imagen que se obtiene de estos estudios captura la estructura de la molécula promediada durante el tiempo. Sin embargo, las innovaciones recientes hicieron posible usar técnicas cristalográficas de rayos X para observar los cambios estructurales fugaces que tienen lugar en el sitio activo mientras una enzima cataliza un solo ciclo de reacción. Esta técnica, llamada *cristalografía en tiempo descompuesto*, puede incluir algún aspecto siguiente:

- Uso de haces de rayos X de ultraelevada intensidad generados por un sincrotrón, el cual es un instrumento empleado por los físicos nucleares para estudiar las partículas subatómicas. Esto puede reducir el periodo de exposición a los rayos X a cuestión de unos picosegundos, que es la misma escala temporal requerida para que una enzima catalice una sola transformación química.
- Enfriamiento de los cristales de enzima a temperaturas de 20 a 40 grados del cero absoluto, lo cual disminuye la reacción en un factor de hasta 10 mil millones, lo que aumenta de forma sumamente notable la duración de los intermediarios transitorios.
- Uso de técnicas para desencadenar al mismo tiempo una reacción en todo el cristal para que todas las moléculas de enzima del cristal estén en la misma etapa de la reacción al mismo tiempo. Por ejemplo, en el caso de una reacción en la que el sustrato sea el ATP, los cristales de enzima pueden infiltrarse con las moléculas del ATP que no estén reactivas porque se unieron con un grupo inerte (p. ej., un grupo nitrofenilo) mediante un enlace fotosensible. Cuando los cristales se exponen a un pulso breve de luz, se liberan todas las moléculas de ATP "enjauladas", lo que inicia la reacción al mismo tiempo en los sitios activos de todo el cristal.
- Uso de enzimas que tienen mutaciones dirigidas a un sitio (página 73) que imponen barreras cinéticas en etapas específicas de la reacción, lo que aumenta la vida de los intermediarios particulares.
- Determinación de la estructura con ultraalta resolución o atómica (p. ej., 0.8 Å), que permite visualizar átomos de hidrógeno individuales que pudieran estar presentes en enlaces de hidrógeno o vinculados con grupos ácidos en la proteína; la presencia o ausencia de moléculas de agua unidas; la conformación precisa de cadenas laterales catalíticas, y la deformación sutil que se produce en algunas partes del sustrato durante la catálisis. La notable claridad de estas imágenes de resolución de alta calidad se ilustra mediante el enlace de hidrógeno en la figura 3-15.

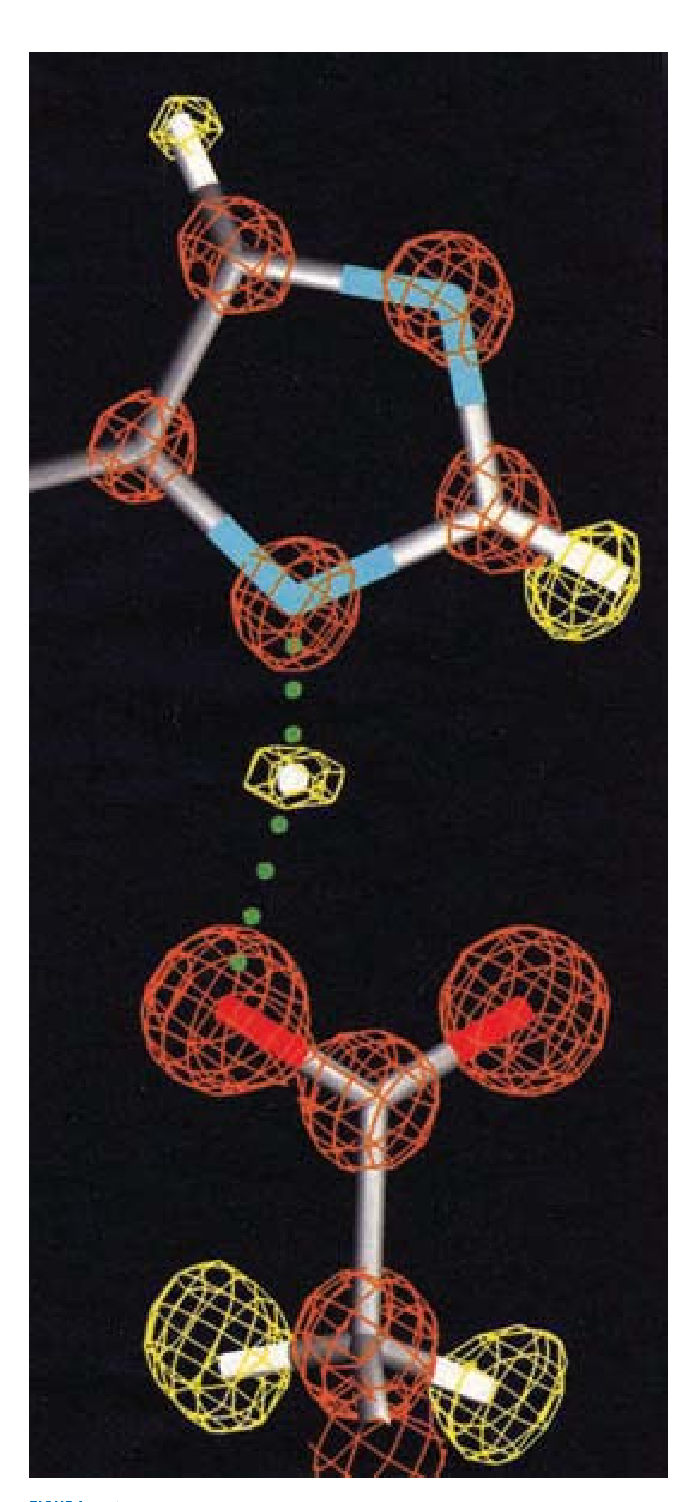


FIGURA 3-15 Mapa de densidad electrónica de un enlace de hidrógeno individual (línea de puntos verdes). Este mapa muestra una porción muy pequeña de la enzima proteolítica subtilisina con resolución atómica (0.78 Å). Se observa que el átomo de hidrógeno (amarillo) es compartido por un átomo de nitrógeno del anillo de un residuo histidina y un átomo de oxígeno de un residuo ácido aspártico. (REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE PETER KÜHN, ET AL., BIOCHEMISTRY 37:13450, 1998, CORTESÍA DE RICHARD BOTT; COPYRIGHT 1998 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY.)

Al combinar estas técnicas, los investigadores pudieron identificar la estructura tridimensional de una enzima en etapas sucesivas durante una sola reacción catalizada. Cuando estas "instantáneas" individuales se colocan en secuencia, producen una "película" que muestra varios intermediarios catalíticos que aparecen y desaparecen a medida que avanza la reacción. La figura 3-16 muestra un ejemplo de los datos que pueden recolectarse con estas técnicas. Se han obtenido resultados similares mediante simulaciones de la dinámica molecular del tipo que se ilustra en las figuras 2-37 y 4-36.

Cinética enzimática

Las enzimas varían bastante en cuanto a su capacidad para catalizar reacciones. La actividad catalítica de una enzima se revela mediante el estudio de su **cinética**, es decir, la velocidad a la que cataliza una reacción en varias condiciones experimentales. En 1913, Leonor Michaelis y Maud Menten notificaron la relación matemática entre la concentración de sustrato y la velocidad de las reacciones enzimáticas medida por la cantidad de producto formado (o sustrato consumido) en un tiempo determinado. Esta relación puede expresarse por una ecuación (que se presenta en la página 103) que genera una hipérbola, como se muestra en la figura 3-17. En lugar de considerar los aspectos teóricos de la cinética enzimática, se puede obtener la misma curva en forma práctica, como se hace para cada enzima estudiada. Para conocer la velocidad de una reacción, se ajusta una mezcla de incubación a la temperatura deseada que contenga todos los ingredientes necesarios, excepto uno, que inicia la reacción cuando se agrega. Si no hay producto en la mezcla al momento en que comienza la reacción, entonces la cantidad de producto que aparezca con el tiempo brinda una medida de la velocidad de reacción. Este procedimiento tiene factores que lo complican. Si el tiempo de incubación es demasiado, la concentración del sustrato se reduce de manera perceptible. Además, conforme aparece el producto, puede convertirse de nueva cuenta en sustrato por la reacción inversa, que también está catalizada por la enzima. Lo ideal es tratar de conocer la velocidad inicial, esto es, la velocidad en el instante cuando aún no se ha formado el producto. Para obtener valores precisos de la velocidad *inicial* de la reacción se emplean tanto periodos de incubación cortos como técnicas de medición sensibles.

Para generar una curva como la que se muestra en la figura 3-17, se determina la velocidad inicial para una serie de mezclas de incubación que contengan la misma cantidad de enzima, pero una concentración creciente de sustrato. A partir de esta curva resulta evidente que la velocidad de reacción inicial varía de manera considerable según sea la concentración de sustrato. Con concentraciones bajas de sustrato, las moléculas de enzima se someten a relativamente pocas colisiones con el sustrato en un tiempo establecido. Por consiguiente, la enzima tiene "tiempo ocioso", es decir, las moléculas de sustrato limitan la velocidad. Con altas concentraciones de sustrato, las enzimas chocan con las moléculas de sustrato con más rapidez de la que pueden convertirse en producto. Por lo tanto, cuando hay concentraciones altas de sustrato, las moléculas individuales de enzima trabajan a su máxima capacidad, esto es, las moléculas de enzima limitan la velocidad. En consecuencia, mientras mayor concentración de

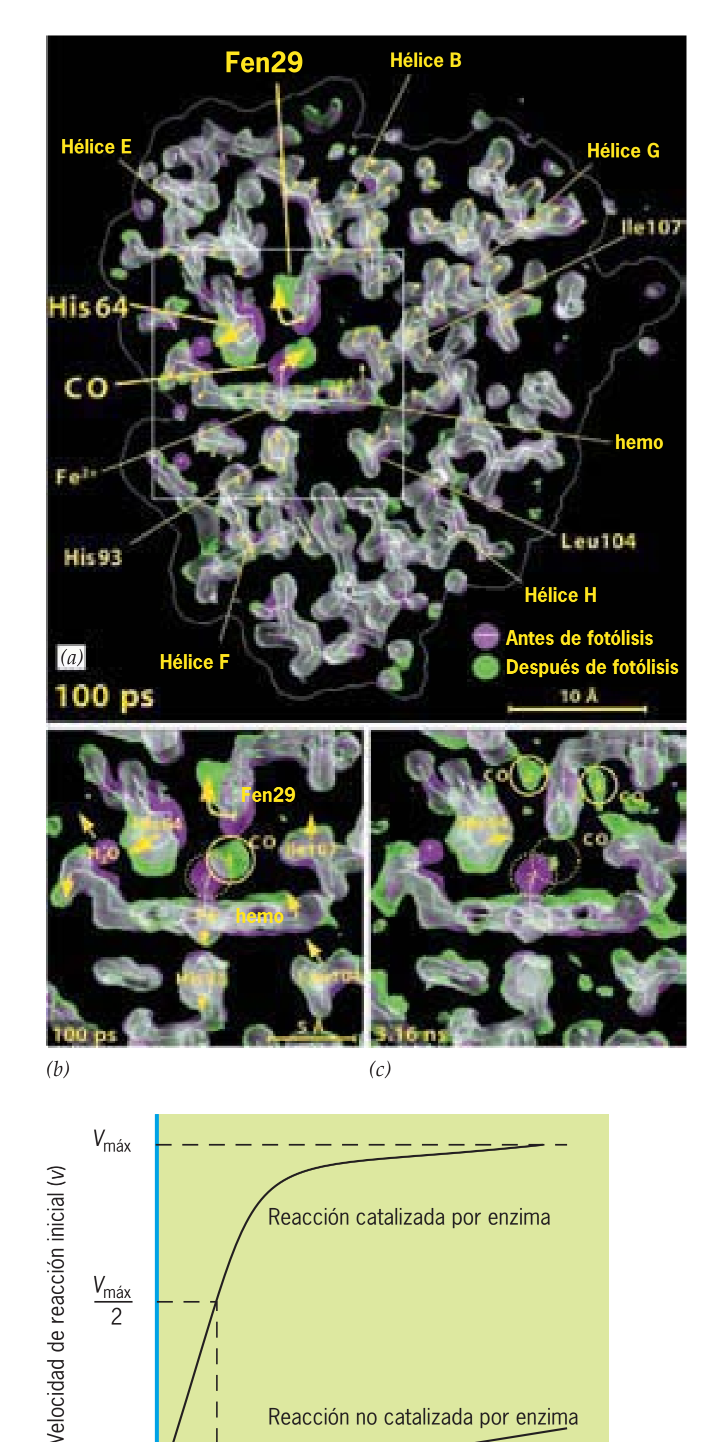


FIGURA 3-16 Mioglobina: la película. En este ejemplo de cristalografía con rayos X en tiempo determinado se identificó la estructura de la mioglobina (Mb) con una molécula de CO unida con el grupo hemo y en varios momentos después que se liberó la molécula de CO. (El CO se une en el mismo sitio en Mb que el O_2, pero es más adecuado para este tipo de estudios.) La liberación de CO se indujo al mismo tiempo en todo el cristal mediante la exposición a un destello de un haz de luz láser (fotólisis). Se reconoció cada una de las estructuras después de un pulso intenso único de rayos X de un sincrotrón. La molécula de mioglobina en estudio tenía una sola sustitución de aminoácido que la convertía en un mejor sujeto para el análisis. *a*) Un corte de 6.5 Å de espesor a través de una molécula de Mb muestra los cambios que ocurren en 100 picosegundos (1 pseg es la billonésima parte de un segundo) después de la liberación de CO de su sitio de unión. La estructura de la Mb antes del destello láser se muestra en color magenta y la estructura de la proteína 100 pseg después del destello láser se muestra en verde. Las partes de la molécula que no cambiaron de estructura en este periodo aparecen en blanco. Se pueden ver tres grandes desplazamientos cerca del sitio de unión del CO (indicados por las flechas amarillas). *b*) Una vista aumentada de la región en el recuadro de la parte *a*). El CO liberado se sitúa a unos 2 Å de su sitio de unión original. El movimiento del CO se acomoda por la rotación de Fen29, la cual empuja a His64 hacia fuera, la que a su vez desprende una molécula de agua. *c*) A los 3.16 nanosegundos después del destello láser, la molécula de CO migró a alguna de las dos posiciones mostradas (marcadas como 2 y 3), Fen29 e His64 se relajaron de regreso a sus estados iniciales y el grupo hemo sufrió un desplazamiento considerable, como lo indica la mayor cantidad de color verde en la región del hemo.
(REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE FRIEDRICH SCHOTTE, ET AL., SCIENCE 300:1946, 2003. COPYRIGHT © 2003, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE.)

FIGURA 3-17 La relación entre la velocidad de una reacción catalizada por una enzima y la concentración de sustrato. Puesto que cada molécula de enzima sólo es capaz de catalizar cierto número de reacciones en un tiempo determinado, la velocidad de la reacción (casi siempre expresada como moles de producto formados por segundo) se aproxima a la velocidad máxima a medida que aumenta la concentración de sustrato. La concentración de sustrato en la cual la reacción alcanza la mitad de la velocidad máxima ($V_{máx}/2$) se conoce como constante de Michaelis o K_M.

sustrato haya en la mezcla de reacción, la enzima se aproxima al estado de *saturación*. La velocidad inicial en este punto de saturación teórico se conoce como **velocidad máxima ($V_{máx}$).**

La medida más simple de la actividad catalítica de una enzima se obtiene de su **número de rotación**, que puede calcularse a partir de la $V_{máx}$. El número de rotación (o constante catalítica, k_{cat}, como también se llama) es el número máximo de moléculas de sustrato que puede convertirse en producto por una sola molécula de enzima por unidad de tiempo. Un número de rotación (por segundo) de 1 a 10^3 es típico para las enzimas, aunque se conocen valores hasta de 10^6 (para la anhidrasa carbónica) (véase cuadro 3-3). A partir de estos valores resulta aparente que relativamente pocas moléculas de enzima pueden convertir con rapidez un número grande de moléculas de sustrato en producto.

El valor de $V_{máx}$ es sólo un término útil que se obtiene de una gráfica como la de la figura 3-17; otra es la **constante de Michaelis (K_M)**, que es igual a la concentración del sustrato cuando la velocidad de reacción es la mitad de la $V_{máx}$. Como su nombre indica, la K_M es la constante para una enzima determinada y por tanto independiente de la concentración de sustrato o enzima. La relación entre $V_{máx}$ y K_M se advierte mejor si se considera la ecuación de Michaelis-Menten, que puede usarse para generar la gráfica que se muestra en la figura 3-17.

$$V = V_{máx} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

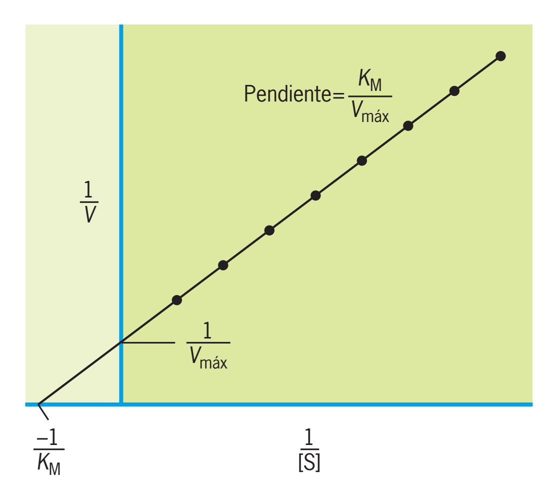


FIGURA 3-18 Gráfica de Lineweaver-Burk que muestra los recíprocos de la velocidad y la concentración del sustrato a partir de los cuales es fácil calcular los valores de la $V_{máx}$ y la K_M.

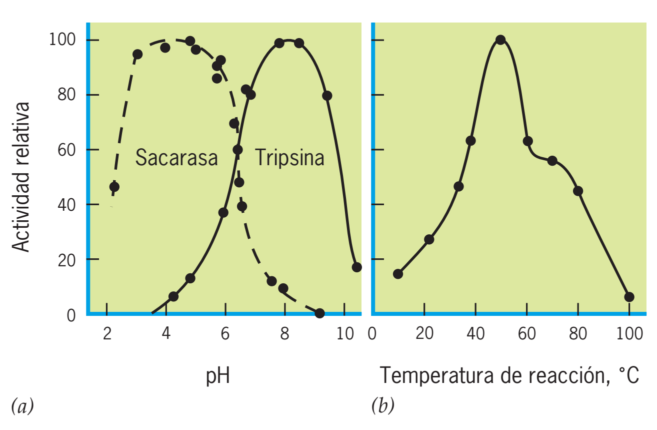


FIGURA 3-19 Dependencia de la velocidad de una reacción catalizada por enzima del pH *a*) y la temperatura *b*). La forma de las curvas y el pH y temperatura óptimos varían según sea la reacción particular. *a*) Los cambios del pH afectan las propiedades iónicas del sustrato y la enzima, así como la conformación de la enzima. *b*) Con temperaturas más bajas, la velocidad de reacción se eleva con el aumento de la temperatura por el incremento de energía en los reactivos. Con temperaturas más altas, este efecto positivo se contrarresta por la desnaturalización de la enzima. (*A*, TOMADA DE E. A, MOELWYN-HUGHES, EN: THE ENZYMES, J. B. SUMNER Y K. MYRBACK (EDS), VOL. 1. ACADEMIC PRESS, 1950. *B*, TOMADA DE K. HAYASHI ET AL., J BIOCHEM 64:93, 1968.)

De acuerdo con la ecuación, cuando la concentración del sustrato [S] se establece en un valor equivalente a la K_M, la velocidad de la reacción (V) se vuelve igual a $V_{máx}/2$, o bien a la mitad de la velocidad máxima. Por consiguiente, K_M = [S] cuando $V = V_{máx}/2$.

Para generar una curva hiperbólica como la que se muestra en la figura 3-17 y hacer un cálculo preciso de los valores de $V_{máx}$ y K_M, deben trazarse un número considerable de puntos. Se obtiene una descripción más sencilla y exacta si se trazan recíprocos de la velocidad contra la concentración del sustrato, como lo formularon Hans Lineweaver y Dean Burk. Al hacerlo, la hipérbola se convierte en línea recta (fig. 3-18), con una intersección en x igual a $-1/K_M$; la intersección de y es igual a $1/V_{máx}$, siendo la pendiente igual a $K_M/V_{máx}$. Por lo tanto, los valores de K_M y $V_{máx}$ son fáciles de obtener mediante la extrapolación de la línea trazada a partir de relativamente pocos puntos.

En la mayoría de los casos, el valor de K_M proporciona una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato. Mientras mayor sea esta constante, es más alta la concentración de sustrato que se requiere para alcanzar la mitad de la $V_{máx}$ y, por consiguiente, es menor la afinidad de la enzima por ese sustrato. La K_M de la mayoría de las enzimas está entre 10^{-1} y 10^{-7}, con un valor típico alrededor de 10^{-4}. Otros factores que influyen de modo notorio en la cinética de las enzimas son el pH y la temperatura del medio de incubación. Cada enzima tiene un pH y temperatura óptimos en los que alcanza su mayor actividad (fig. 3-19). La influencia de la temperatura en la actividad enzimática es ilustrada por el notable efecto provocado por la refrigeración, el cual desacelera la proliferación de los microorganismos.

Inhibidores enzimáticos Los **inhibidores enzimáticos** son moléculas que pueden unirse con una enzima y disminuir su actividad. La célula depende de inhibidores para regular la actividad de muchas de sus enzimas; los especialistas en bioquímica emplean inhibidores para estudiar las propiedades de las enzimas y muchas compañías bioquímicas producen inhibidores enzimáticos que actúan como fármacos, antibióticos o pesticidas. Los inhibidores enzimáticos pueden dividirse en dos tipos: reversibles o irreversibles. A su vez, los inhibidores reversibles pueden considerarse competitivos o no competitivos.

Los **inhibidores irreversibles** son los que se unen con gran firmeza a una enzima, a menudo mediante la formación de un enlace covalente con alguno de sus residuos de aminoácidos. Varios gases nerviosos, como el diisopropilfosfofluoridato y los pesticidas organofosforados, actúan como inhibidores irreversibles de la acetilcolinesterasa, una enzima que tiene un papel crucial en la destrucción de la acetilcolina, el neurotransmisor encargado de producir la contracción muscular. Con la inhibición de la enzima, el músculo se estimula en forma continua y permanece en estado de contracción constante. Como se describe en la sección Perspectiva humana, la penicilina actúa como inhibidor irreversible de una enzima clave para la formación de la pared celular bacteriana.

Por otro lado, los inhibidores reversibles sólo se unen en forma débil con la enzima, por lo que son fáciles de desplazar. Los **inhibidores competitivos** son inhibidores reversibles que compiten con un sustrato por el acceso al sitio activo de una enzima. Como los sustratos tienen una estructura complementaria con el sitio activo al cual se unen, los inhibidores competitivos deben parecerse al sustrato para competir por el mismo sitio de unión, pero difieren de tal manera que les impide transformarse en el producto (fig. 3-20). El análisis de los tipos de moléculas que pueden competir con el sustrato por un sitio de unión en la enzima proporciona información sobre la estructura del sitio activo y la naturaleza de la interacción entre el sustrato natural y su enzima.

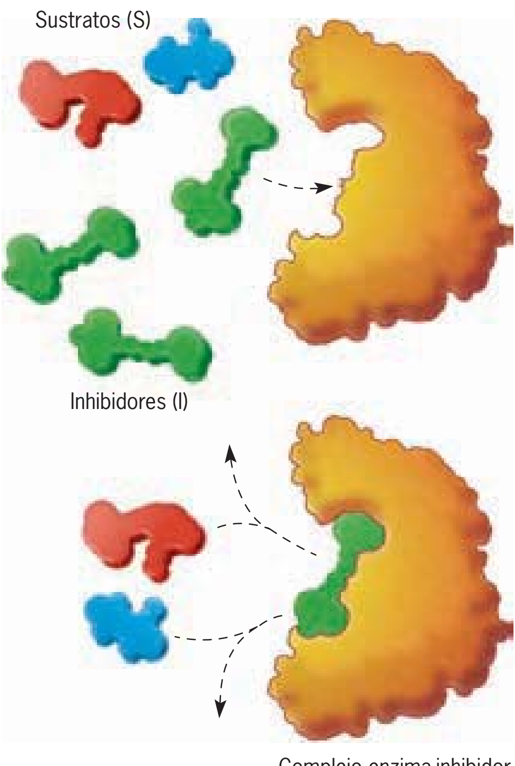


FIGURA 3-20 Inhibición competitiva. Debido a su similitud molecular, los inhibidores competitivos pueden competir con el sustrato por un sitio de unión en la enzima. El efecto de un inhibidor competitivo depende de las concentraciones relativas del inhibidor y el sustrato.

La inhibición enzimática competitiva es la base de la actividad de múltiples fármacos de uso frecuente, como se ilustra con el siguiente ejemplo. La enzima convertidora de angiotensina (ECA) es una enzima proteolítica que actúa sobre un péptido de 10 residuos (angiotensina I) para producir un péptido de ocho residuos (angiotensina II). El nivel alto de angiotensina II es un factor de riesgo mayor para la elevación de la presión sanguínea (*hipertensión*). En el decenio de 1960, John Vane y colaboradores de Eli Lilly Company empezaron a investigar en busca de compuestos que pudieran inhibir la ECA. Estudios previos habían mostrado que el veneno de un crótalo de Brasil contenía inhibidores de enzimas proteolíticas y se encontró que uno de los componentes de este veneno, un péptido llamado teprótido

Teprótido (el enlace peptídico se marca en rojo)

era un inhibidor competitivo potente de la ECA. Aunque el teprótido redujo la presión sanguínea en pacientes hipertensos, no resultó muy útil como medicamento porque tenía una estructura peptídica y, por tanto, se degradaba con rapidez si se consumía por vía oral. Los esfuerzos posteriores para desarrollar inhibidores no peptídicos de la enzima llevaron a los investigadores a sintetizar un compuesto llamado captoprilo,

Captoprilo

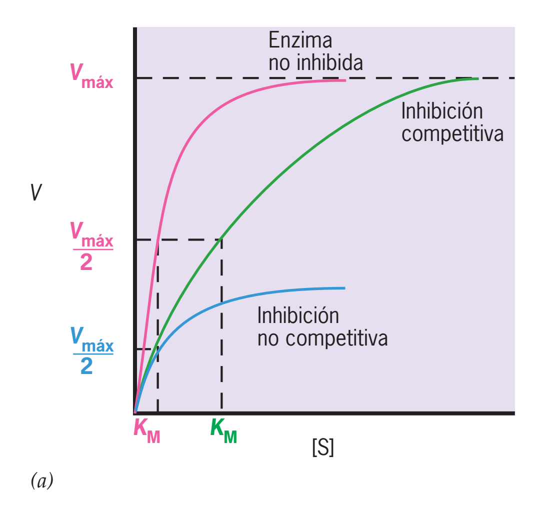
que se convirtió en el primer antihipertensivo útil que actuaba mediante la unión con la enzima convertidora de angiotensina.

La efectividad de un inhibidor competitivo depende de su afinidad relativa por la enzima. Al margen de lo anterior, la inhibición competitiva puede superarse si el índice sustrato/inhibidor es lo bastante grande. En otras palabras, si el número de colisiones entre la enzima y el inhibidor se vuelve insignificante en relación con las colisiones entre la enzima y su sustrato, el efecto del inhibidor se vuelve mínimo. Dada una concentración suficiente de sustrato, aún es posible alcanzar en teoría la velocidad máxima de la enzima en presencia del inhibidor competitivo.

En la **inhibición no competitiva**, el sustrato y el inhibidor no compiten por el mismo sitio de unión; por lo general, el inhibidor actúa en un sitio distinto al punto activo de la enzima. El nivel de inhibición depende sólo de la concentración del inhibidor y el aumento de la concentración de sustrato no puede vencerlo. Dado que en la presencia de un inhibidor no competitivo una determinada fracción de las moléculas de enzima permanece inactiva en un instante particular, no puede alcanzarse la velocidad máxima de la población de moléculas enzimáticas. Los efectos en la cinética enzimática en presencia de inhibidores competitivos y no competitivos se muestra en la figura 3-21. En un caso, la $V_{máx}$ disminuye y en el otro la K_M aumenta. En ambos tipos, la pendiente ($K_M/V_{máx}$) se incrementa en relación con la reacción no inhibida. Como se describe en la página 115, las células utilizan una versión de inhibición no competitiva para regular la actividad de enzimas clave de las vías metabólicas.

REVISIÓN ?

1. ¿Cómo es posible tener una reacción caracterizada por una ΔG grande y una E_A pequeña?, ¿y con una E_A grande y una ΔG pequeña?
2. Explique cómo las enzimas pueden ser tan específicas en relación con los sustratos con los que se unen.
3. Examine la figura 3-13 que ilustra los pasos de una reacción catalizada por enzimas y describa qué ocurre sin leer el pie de la figura o el texto correspondiente.
4. Distinga entre el número de rotación y la $V_{máx}$.



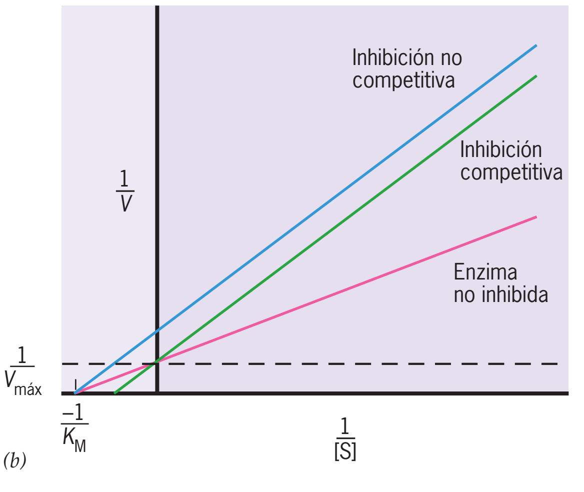


FIGURA 3-21 Los efectos de los inhibidores en la cinética enzimática. El efecto de los inhibidores competitivos y no competitivos se observa cuando la cinética de la reacción se grafica como la velocidad de la reacción contra la concentración del sustrato *a*) o como su recíproco *b*). El inhibidor no competitivo disminuye la $V_{máx}$ sin afectar la K_M, mientras que el competitivo aumenta la K_M sin afectar la $V_{máx}$.

PERSPECTIVA HUMANA

El problema creciente de la resistencia a los antibióticos

No hace mucho tiempo se creía que la salud humana ya no se vería amenazada por infecciones bacterianas graves. Las enfermedades bacterianas como tuberculosis, neumonía, gonorrea y docenas de padecimientos más se curaban con la administración de cualesquiera de los múltiples antibióticos, compuestos que destruyen bacterias en forma selectiva sin dañar al hospedador humano en el que crecen. Esta situación ha cambiado de modo impresionante en el último par de décadas, a medida que las bacterias patógenas se han hecho cada vez más resistentes a estos "medicamentos maravillosos", lo que ha causado la muerte de muchas personas que en otro tiempo pudieron haber sido tratadas con éxito. Para empeorar las cosas, la industria farmacéutica ha reducido drásticamente los recursos destinados al desarrollo de nuevos antibióticos. Este cambio de acciones por parte de dicha industria suele atribuirse a a) falta de incentivos económicos: los antibióticos sólo se usan por periodos breves (a diferencia de los fármacos que se prescriben para afecciones crónicas como diabetes o depresión); b) los nuevos antibióticos corren el riesgo de tener un tiempo de vida en el mercado relativamente corto, ya que las bacterias se hacen resistentes a cada producto sucesivo, y c) se evita el uso generalizado de los antibióticos más eficaces, y en cambio se les reserva como último recurso cuando otros fármacos han fallado. Se han analizado ampliamente ideas para la creación de instituciones no lucrativas dedicadas al desarrollo de nuevos antibióticos.

Aquí se presenta brevemente el mecanismo de acción de los antibióticos, en particular los que se dirigen contra enzimas, tema de este capítulo, y el desarrollo de la resistencia bacteriana. La mayoría de los antibióticos son productos naturales producidos por microorganismos para destruir a otros microorganismos. Varios tipos de blancos en las células bacterianas han resultado más vulnerables. Entre ellos se incluyen los siguientes:

1. *Enzimas participantes en la síntesis de la pared bacteriana.* La penicilina y sus derivados son análogos estructurales de los sustratos de un grupo de transpeptidasas que catalizan las reacciones finales de enlaces cruzados que confieren la rigidez a la pared celular. Si estas reacciones no ocurren, no se desarrollará una pared celular rígida. La penicilina es un inhibidor irreversible de las transpeptidasas; el antibiótico se adapta al sitio activo de estas enzimas y forma un complejo de enlace covalente que no puede desplazarse. El antibiótico vancomicina (que al principio derivó de un microorganismo que vive en muestras de tierra tomadas de Borneo) inhibe la transpeptidación porque se une con el sustrato de la transpeptidasa, no con la enzima misma. En condiciones normales, el sustrato de la transpeptidasa termina en un dipéptido D-alanina-D-alanina. Para volverse resistente a la vancomicina, una célula bacteriana debe sintetizar un término alternativo que no se una con el fármaco, lo cual es un proceso alternativo que requiere la adquisición de muchas actividades enzimáticas nuevas. Como resultado, la vancomicina es el antibiótico al cual las bacterias han sido menos capaces de desarrollar resistencia, por lo que casi siempre se emplea como último recurso cuando fallan otros antimicrobianos. Por desgracia, en los últimos años han surgido cepas de varias bacterias patógenas resistentes a la vancomicina, entre ellas *Staphylococcus aureus*. Esta última es un habitante común de la superficie del cuerpo humano. Aunque suele ser relativamente inofensiva, es la causa más frecuente de infecciones potencialmente letales en personas hospitalizadas que se recuperan de cirugía o tienen alguna deficiencia del sistema inmunitario. Durante años, las cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) han causado estragos en pabellones de hospitales, al causar la muerte de decenas de miles de pacientes. En muchos casos, la vancomicina es el único fármaco capaz de detener estas infecciones. En consecuencia, fue alarmante descubrir que MRSA puede hacerse resistente a la vancomicina al adquirir un

grupo de genes de resistencia a vancomicina de otras bacterias (*E. faecium*), que también es una causa común de infecciones nosocomiales. Hasta la fecha, no hay informes de que MRSA resistente a vancomicina haya logrado poner un pie en un hospital o ambiente comunitario, pero tal vez sólo sea cuestión de tiempo. Por ello, los especialistas en enfermedades infecciosas han urgido a los hospitales a instituir mejores programas de higiene, los cuales tienen probada eficacia para reducir la incidencia de infecciones letales.

2. *Componentes del sistema por el cual las bacterias duplican, transcriben y traducen su información genética.* Aunque las células procariotas y eucariotas tienen un sistema similar para almacenar y utilizar la información genética, existen muchas diferencias básicas entre los dos tipos de células que los farmacólogos pueden aprovechar. Por ejemplo, la estreptomicina y las tetraciclinas se unen con los ribosomas procariotas, pero no con los ribosomas eucariotas. Las quinolonas, que son un raro ejemplo de los antibióticos del todo sintéticos (no se basan en productos naturales), inhiben a la enzima girasa del DNA, necesaria para la replicación bacteriana del DNA. La quinolona prescrita con mayor frecuencia es la ciprofloxacina (fig. 1).

Casi todos los antibióticos nuevos son derivados de compuestos ya existentes, los cuales se han sometido a modificación química en el laboratorio. Los nuevos compuestos suelen elegirse por uno de dos métodos. El compuesto se prueba en cuanto a su capacidad de unirse a una proteína blanco específica (que se ha purificado de células bacterianas) e inhibirla, y se investiga su capacidad de destruir células bacterianas en cultivo o en un animal de laboratorio. Resulta notable que desde 1963 sólo se hayan desarrollado dos nuevas clases de antibióticos. Una de estas clases incluye la linezolida, que actúa de manera específica en los ribosomas bacterianos e interfiere la síntesis de proteínas. La linezolida se lanzó al mercado en 2000; en el transcurso del año siguiente apareció el primer informe de resistencia a la linezolida en *S. aureus*. La otra clase nueva de antibióticos, que incluye la daptomicina, salió al mercado en 2003. Se trata de lipopéptidos cíclicos que alteran el funcionamiento de la membrana bacteriana. Muchos investigadores esperan que linezolida y daptomicina se utilicen sólo ocasionalmente, a fin de minimizar la resistencia a ellas.

3. *Enzimas que catalizan reacciones metabólicas específicas de bacterias.* Por ejemplo, las sulfas son antibióticos efectivos porque se parecen mucho al compuesto ácido *p*-aminobenzoico (PABA):

$H_2N-C_6H_4-COOH$ (PABA) $H_2N-C_6H_4-SO_2-NH-R$ (Sulfas)

PABA Sulfas

las bacterias lo convierten por medios enzimáticos en la coenzima esencial ácido fólico. Debido a que los seres humanos carecen de una enzima que sintetice ácido fólico, deben obtener esta coenzima esencial de la dieta y, como consecuencia, las sulfas no tienen efecto en el metabolismo humano.

Las bacterias se tornan resistentes a los antibióticos a través de diversos mecanismos, muchos de los cuales pueden ilustrarse con la penicilina. La penicilina es un lactámico beta, es decir, que contiene un anillo lactámico beta característico de cuatro elementos (mostrado en color).

```
            R
            |
            C=O
            |
           HN
            |       H    S
           HC ----- C  /   \  C  / CH3
            |       |         |  \ CH3
            C ----- N ------- CH
          //                    \
         O                       COO⁻
```

Penicilina

Ya desde 1940, los investigadores descubrieron que ciertas bacterias tienen una enzima llamada lactamasa beta (o penicilinasa) que puede abrir el anillo lactámico, lo que hace que el compuesto sea inocuo para la bacteria. Al momento en que la penicilina se introdujo como antibiótico durante la Segunda Guerra Mundial, ninguna de las bacterias que causaban las principales enfermedades tenía un gen para producir lactamasa beta. Esto puede verificarse si se examina el DNA de las bacterias descendientes de cultivos de laboratorio que se iniciaron en la era anterior a los antibióticos. Hoy en día, el gen para la lactamasa beta está presente en una gran variedad de bacterias infecciosas y la producción de lactamasa beta en estas células es la principal causa de la resistencia a la penicilina. ¿Cómo es que estas especies adquirieron el gen?

La ocurrencia difundida del gen para la lactamasa beta muestra con qué facilidad los genes pueden diseminarse de una bacteria a otra, no sólo entre las células de una especie determinada, sino entre las especies. Esto puede suceder de varias maneras: a) conjugación (que se muestra en la figura 1-13), en la que el DNA pasa de una célula bacteriana a otra; b) transducción, en la que un gen bacteriano se traslada de una célula a otra por un virus, y c) transformación, en la que la célula bacteriana es capaz de captar DNA desnudo de su ambiente. Los farmacólogos intentaron contrarrestar la diseminación de la lactamasa beta mediante la síntesis de derivados de la penicilina (p. ej., cefuroxima) que son más resistentes a la enzima hidrolítica. Como era de esperar, la selección natural pronto conduce a la evolución de bacterias cuya lactamasa beta puede dividir las nuevas formas del antibiótico.

No todas las bacterias resistentes a la penicilina adquirieron un gen para lactamasa beta. Algunas son resistentes porque tienen modi-

FIGURA 1 Una escena de la investigación del carbunco en 2001. Las personas expuestas a las esporas de carbunco enviadas por el correo fueron tratadas exitosamente con ciprofloxacina. (TOMADA DE ROBERTO BOREA/AP.)

ficaciones en su pared celular que bloquea la entrada del antibiótico; otras son resistentes porque pueden exportar en forma selectiva el antibiótico una vez que ingresó a la célula; otras más son resistentes porque tienen transpeptidasas modificadas que no se unen con el antibiótico. Por ejemplo, la meningitis bacteriana se debe a la bacteria *Neisseria meningitidis*, que aún se debe mostrar evidencia de que adquirió la lactamasa beta. Sin embargo, esta bacteria comienza a tornarse resistente a la penicilina porque sus transpeptidasas han perdido la afinidad por los antibióticos.

El problema de la resistencia a los antibióticos no se limita a las enfermedades bacterianas, sino que también se convirtió en un problema importante en el tratamiento del sida. A diferencia de las bacterias, cuyas enzimas para replicación del DNA operan con una precisión muy alta, la enzima replicadora del virus del sida (VIH), llamada *transcriptasa inversa*, comete un gran número de errores, lo que da origen a un alto índice de mutaciones. Este alto índice de errores (casi un error por cada 10 000 bases duplicadas), combinado con la gran velocidad de producción viral ($> 10^8$ partículas virales producidas en una persona cada día), eleva en gran proporción la probabilidad de que surjan variantes resistentes a los fármacos en una persona conforme progresa la infección. Este problema se combate en dos formas:

- Se administran varios fármacos enfocados en distintas enzimas virales. Esto disminuye bastante la probabilidad de que aparezca una variante resistente a todos los fármacos.
- Mediante el diseño de fármacos que interactúen con las porciones más conservadas de cada enzima blanco, esto es, las porciones en las que las mutaciones tienen mayor probabilidad de producir una enzima defectuosa. Este punto subraya la importancia del conocimiento de la estructura y función de la enzima blanco y la manera en que los fármacos potenciales interactúan con ese blanco.

3.3 METABOLISMO

El **metabolismo** es el cúmulo de reacciones bioquímicas que ocurren dentro de una célula y que incluyen una tremenda diversidad de conversiones moleculares. La mayoría de estas reacciones puede agruparse en **vías metabólicas** que contienen una secuencia de reacciones químicas en las que una enzima específica cataliza cada reacción y el producto de una reacción es el sustrato de la siguiente. Las enzimas que constituyen una vía metabólica casi siempre se conectan con una región específica de la célula, como la mitocondria o el citosol. Cada vez hay más evidencia que sugiere que las enzimas de una vía metabólica tienen con frecuencia vínculos físicos entre ellas, un rasgo que permite que el producto de una enzima se entregue de manera directa como sustrato en el sitio activo de la siguiente enzima en la secuencia de reacciones.

Los compuestos formados en cada paso a lo largo de la vía son **intermediarios metabólicos** (o *metabolitos*) que al final conducen a la formación de un producto terminal. Los productos terminales son moléculas con un papel particular en la célula, como un aminoácido que puede incorporarse en un polipéptido o un azúcar que puede consumirse por su contenido energético. Las vías metabólicas de una célula están interconectadas en varios puntos, por lo que el compuesto que se genera en una vía puede enviarse en varias direcciones, según sean los requerimientos de la célula en ese momento. Esta sección se enfoca en los aspectos del metabolismo que conducen a la transferencia y utilización de la energía química dentro de la célula, ya que este tema se trata en todo el libro.

Una revisión del metabolismo

Las vías metabólicas pueden dividirse en dos grandes tipos. Las **vías catabólicas** se encargan de degradar moléculas complejas para formar productos más sencillos. Las vías catabólicas tienen dos funciones: obtener materias primas disponibles, a partir de las cuales puedan sintetizarse otras moléculas, y proporcionar la energía química necesaria para las múltiples actividades de una célula. Como se describe con detalle, la energía liberada en las vías catabólicas se almacena por un tiempo en dos formas: como fosfatos de alta energía (sobre todo ATP) y como electrones de alta energía (sobre todo NADPH). Las **vías anabólicas** conducen a la síntesis de compuestos más complejos a partir de materiales iniciales más simples. Las vías anabólicas requieren energía y usan la energía química liberada por las vías catabólicas exergónicas.

La figura 3-22 muestra un perfil muy simplificado de las maneras en que las principales vías anabólicas y catabólicas se interconectan. Primero se desensamblan (hidrolizan) las macromoléculas en los bloques de construcción que las componen (etapa I, figura 3-22). Una vez que las macromoléculas se hidrolizaron en sus componentes (aminoácidos, azúcares y ácidos grasos), la célula puede utilizar de nueva cuenta los bloques de construcción: a) para formar otras macromoléculas de la misma clase (etapa I), b) convertirlas en compuestos diferentes para sintetizar otros productos o c) degradarlas más (etapas II y III, figura 3-22) para extraer una medida de su contenido de energía libre.

Las vías para la degradación de los diversos bloques de construcción de las macromoléculas varían de acuerdo con el compuesto particular que se degrade. Sin embargo, al final todas estas moléculas se convierten en una pequeña variedad de compuestos que pueden metabolizarse de manera similar. Así, aunque las sustancias comiencen como macromoléculas con estructura muy diferente, en las vías catabólicas se transforman en los mismos metabolitos de bajo peso molecular. Por esta razón se dice que las vías catabólicas son convergentes.

Un hecho notable es que las reacciones químicas y las vías metabólicas descritas en este capítulo se encuentran en todas las células vivas, desde la bacteria más sencilla hasta la planta o

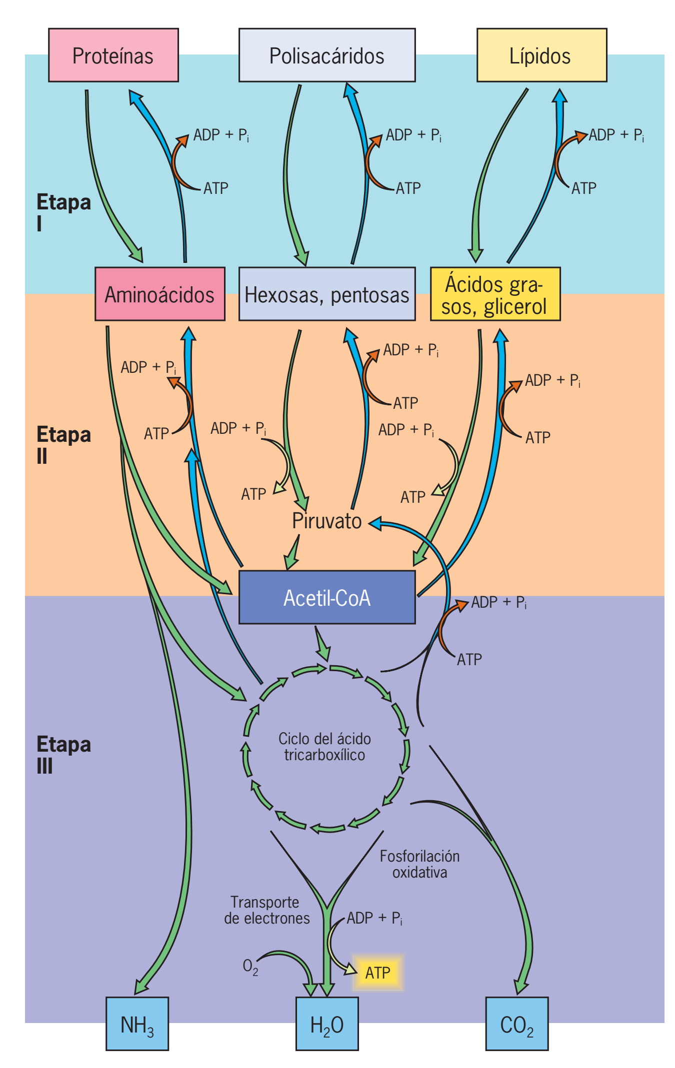


FIGURA 3-22 Tres etapas del metabolismo. Las vías catabólicas (flechas verdes hacia abajo) convergen para formar los metabolitos comunes y conducen a la síntesis de ATP en la etapa III. Las vías anabólicas (flechas azules hacia arriba) comienzan de unos cuantos precursores en la etapa III y utilizan ATP para sintetizar una gran variedad de materiales celulares. Las vías metabólicas para los ácidos nucleicos son más complejas y no se muestran aquí. (TOMADA DE A. L. LEHNINGER. BIOCHEMISTRY, 2ND ED., 1975. WORTH PUBLISHERS, NUEVA YORK.)

animal más complejos. Es evidente que estas vías aparecieron muy pronto y que se han conservado durante todo el curso de la evolución biológica.

Oxidación y reducción: una cuestión de electrones

Las vías catabólicas y anabólicas incluyen reacciones clave en las que los electrones se transfieren de un reactivo a otro. Las reacciones que implican un cambio en el estado electrónico de los reactivos se llaman **reacciones de oxidación-reducción** (o **redox**). Los cambios de este tipo implican la ganancia o pérdida de electrones. Considérese la conversión del hierro metálico (Fe^0) en su estado ferroso (Fe^{2+}), en el que el átomo de hierro pierde dos electrones, con lo que cambia a un estado más positivo. Cuando un átomo pierde uno o más electrones, se dice que se *oxida*. La reacción es reversible, lo que significa que los iones ferrosos pueden convertirse en hierro metálico, un estado más negativo, mediante la obtención de un par de electrones. Cuando un átomo gana uno o más electrones, se dice que se *reduce*.

Para que el hierro metálico se oxide, debe haber alguna sustancia que acepte los electrones que se liberan. Por el contrario, para que los iones ferrosos se reduzcan, debe existir alguna sustancia que done los electrones necesarios. En otras palabras, la oxidación de un reactivo debe acompañarse de la reducción simultánea de otro, y viceversa. Una posible reacción con el hierro podría ser

$$Fe^0 + Cu^{2+} \rightleftharpoons Fe^{2+} + Cu^0$$

La sustancia que se oxida durante una reacción de oxidación-reducción, es decir, la que pierde electrones, se llama **agente reductor**, y la que se reduce, esto es, la que gana electrones, se llama **agente oxidante**.

La oxidación o reducción de los metales, como el hierro o el cobre, suponen la pérdida o ganancia completas de electrones. No puede ocurrir lo mismo con la mayoría de los compuestos orgánicos por la siguiente razón: la oxidación y reducción de los sustratos orgánicos durante el metabolismo celular incluyen átomos de carbono que tienen enlaces covalentes con otros átomos. Como se describió en el capítulo 2, cuando dos átomos diferentes comparten un par de electrones, los electrones están unidos con más fuerza al átomo del enlace polarizado. En un enlace C—H, el átomo de carbono tiene la mayor tracción sobre los electrones; por tanto, puede decirse que el átomo de carbono está en estado reducido. Por otro lado, si un átomo de carbono se une con un átomo más electronegativo, como en el enlace C—O o el C—N, los electrones están más lejos del átomo de carbono, por lo que éste se halla en estado oxidado. Puesto que el carbono tiene cuatro electrones exteriores que tal vez comparta con otros átomos, puede haber diversos estados de oxidación. Esto se ilustra con el átomo de carbono en una serie de moléculas con un carbono (fig. 3-23), desde el estado reducido completo en el metano (CH_4) hasta el estado oxidado total del dióxido de carbono (CO_2). Se puede conocer el estado de oxidación relativa de una molécula orgánica si se cuenta el número de átomos de hidrógeno respecto del oxígeno y nitrógeno por átomo de carbono. Como se ve más adelante, el estado de oxidación de los átomos de carbono en una molécula orgánica suministra una medida del contenido de energía libre de la molécula.

La captura y utilización de energía

Los compuestos que se utilizan como combustibles químicos para el funcionamiento de hornos y automóviles son compuestos orgánicos muy reducidos, como el gas natural (CH_4) y derivados del petróleo. La energía se libera cuando estas moléculas se queman en presencia de oxígeno, lo que lleva a los carbonos a estados más oxidados, como en el caso de los gases monóxido de carbono y dióxido de carbono. El grado de reducción de un compuesto también es una medida de su capacidad para realizar trabajo químico dentro de la célula. Mientras más átomos

H—C—H (with H above and below) → H—C—OH (with H above and below) → H—C=O (with H above) → H—C=O (with HO above) → C=O (with O above)

Metano (CH_4)

Metanol (CH_3OH)

Formaldehído (CH_2O)

Ácido fórmico (HCOOH)

Dióxido de carbono (CO_2)

Estado más reducido → Estado más oxidado

— Enlace covalente en el que el átomo de carbono tiene mayor proporción del par de electrones

— Enlace covalente en el que el átomo de oxígeno tiene mayor proporción del par de electrones

FIGURA 3-23 El estado de oxidación de un átomo de carbono depende de los demás átomos a los que está unido. Cada átomo de carbono puede formar un máximo de cuatro enlaces con otros átomos. Esta serie de moléculas sencillas de un carbono ilustra los diversos estados de oxidación en los que puede existir el átomo de carbono. En su estado más reducido, el carbono se une con cuatro hidrógenos (forma metano); en su estado más oxidado, el átomo de carbono se une con dos oxígenos (forma dióxido de carbono).

de hidrógeno puedan separarse de una molécula de "combustible", más ATP puede producirse. Los carbohidratos son ricos en energía química porque contienen cadenas de unidades (H—C—OH). Las grasas contienen aún más energía por unidad de peso porque contienen cadenas de unidades (H—C—H) más reducidas. La siguiente descripción se concentra en los carbohidratos.

Como el único bloque de construcción del almidón y el glucógeno, la glucosa es la molécula clave en el metabolismo energético de plantas y animales. La energía libre liberada por la oxidación completa de la glucosa es muy grande:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O$$
$$\Delta G°' = -686\ \text{kcal/mol}$$

En comparación, la energía libre necesaria para convertir ADP en ATP es relativamente pequeña:

$$ADP + P_i \rightarrow ATP + H_2O \qquad \Delta G°' = +7.3\ \text{kcal/mol}$$

A partir de estas cifras resulta evidente que la oxidación completa de una molécula de glucosa hasta CO_2 y H_2O puede liberar energía suficiente para producir una gran cantidad de moléculas de ATP. Como se advierte en el capítulo 5, se forman hasta 36 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa oxidada en condiciones que existen dentro de la mayoría de las células. Para que se produzcan tantas moléculas de ATP, la molécula de azúcar se separa en muchos pasos pequeños. Los pasos en los que la diferencia de energía libre entre los reactivos y los productos es relativamente grande pueden unirse con reacciones que conducen a la producción de ATP.

El catabolismo de la glucosa tiene dos etapas básicas y son idénticas en todos los organismos aerobios. La primera etapa, la **glucólisis**, ocurre en la fase soluble del citoplasma (el citosol) y deriva en la formación de piruvato. La segunda etapa es el **ciclo del ácido tricarboxílico** (o **TCA**) que ocurre dentro de las mitocondrias de las células eucariotas y en el citosol de las procariotas; conduce a la oxidación final de los átomos de carbono hasta dióxido de carbono. La mayor parte de la energía química de la glucosa se almacena en forma de electrones de alta energía, que se eliminan a medida que las moléculas del sustrato se oxidan durante la glucólisis y el ciclo del TCA. La energía de estos electrones es la que se usa al final para sintetizar ATP. Las siguientes páginas se concentran en los pasos de la glucólisis, la primera etapa en la oxidación de la glucosa, que ocurre sin la participación del oxígeno. Se presupone que ésta es la vía de captura de energía que utilizaron los primeros ancestros anaerobios y aún permanece como la principal vía anabólica empleada por organismos anaerobios hoy en día. En el capítulo 5 se completa la historia de la oxidación de la glucosa, cuando se describe la estructura de la mitocondria y su papel en la respiración aeróbica.

Glucólisis y formación de ATP Las reacciones de la glucólisis y las enzimas que las catalizan se muestran en la figura 3-24. Antes de describir las reacciones específicas, puede señalarse un punto importante concerniente a la termodinámica del metabolismo. En una discusión previa se señaló la diferencia entre ΔG y $\Delta G°'$; la ΔG de una reacción particular es la que determina su dirección en la célula. Las mediciones reales de las concentraciones de metabolitos en la célula pueden revelar el valor de ΔG en una reacción en cualquier momento dado. La figura 3-25 muestra los valores típicos de ΔG medidos para las reacciones de la glucólisis. En cambio con los valores de $\Delta G°'$ de la figura 3-24, todas excepto tres reacciones tienen valores de ΔG cercanos a cero, esto es, que están cerca del equilibrio. Las tres reacciones que están lejos del equilibrio, y que las vuelve irreversibles

1 Hexocinasa $\Delta G°' = -4.0$ ATP ADP
Glucosa → Glucosa 6-fosfato
2 Isomerasa de fosfoglucosa $\Delta G°' = +0.4$
Glucosa 6-fosfato → Fructosa 6-fosfato
3 Fosfofructocinasa $\Delta G°' = -3.4$ ATP ADP
Fructosa 6-fosfato → Fructosa 1,6-difosfato
4 Aldolasa $\Delta G°' = +5.7$
Fructosa 1,6-difosfato → Gliceraldehído 3-fosfato + Dihidroxiacetona fosfato
5 Isomerasa de triosa fosfato $\Delta G°' = +1.8$
Gliceraldehído 3-fosfato (2 moléculas por cada glucosa inicial)
6 $\Delta G°' = +1.5$ Deshidrogenasa de fosfato de gliceraldehído P_i NAD^+ NADH + H^+
Portador de 2 electrones
1,3-difosfoglicerato
7 Cinasa de fosfoglicerato ATP ADP $\Delta G°' = -4.5$
3-fosfoglicerato
8 Fosfogliceromutasa $\Delta G°' = +1.1$
2-fosfoglicerato
9 Enolasa $\Delta G°' = +0.4$ H_2O
Fosfoenolpiruvato
10 Cinasa de pivurato $\Delta G°' = -7.5$ ADP ATP
Piruvato

FIGURA 3-24 Los pasos de la glucólisis.

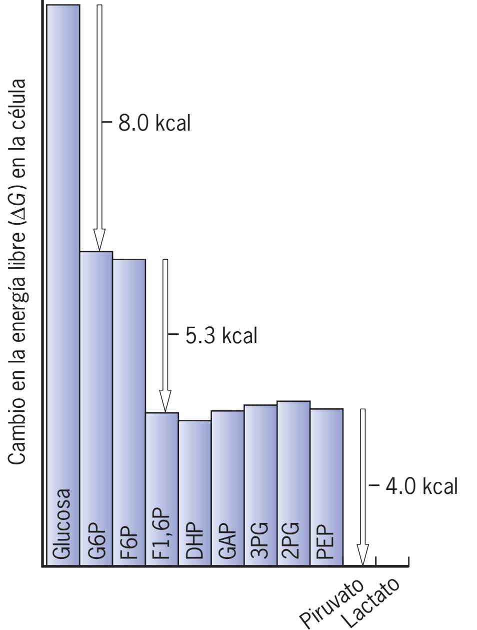


FIGURA 3-25 Perfil de energía libre de la glucólisis en el eritrocito humano. Todas las reacciones están cerca o en estado de equilibrio, excepto las catalizadas por la hexocinasa, fosfofructocinasa y cinasa de piruvato, que muestran grandes diferencias en su energía libre. En la célula, todas las reacciones deben proceder con un declive en la energía libre; los pequeños incrementos de la energía libre que se muestran aquí deben considerarse como derivados de errores en las mediciones experimentales de las concentraciones de metabolitos. (Tomada de A. L. Lehninger, Biochemistry, 2nd ed., 1975. Worth Publishers, Nueva York.)

dentro de la célula, proporcionan la fuerza necesaria de impulso que mueve los metabolitos por la vía glucolítica en una forma dirigida.

En 1905, dos químicos británicos, Arthur Harden y William Young, estudiaban la degradación de la glucosa en células de levaduras, un proceso que produce burbujas de gas CO_2. Harden y Young notaron que al final el burbujeo disminuía y se detenía, incluso si había aún mucha glucosa que metabolizar. Parecía que algún otro componente esencial del caldo se agotaba. Después de experimentar con diversas sustancias, los químicos encontraron que la adición de fosfatos inorgánicos reactivaba la reacción. Concluyeron que la reacción agotaba el fosfato, el primer indicio de que los grupos fosfato tenían un papel en las vías metabólicas. La importancia del grupo fosfato se ilustra con las reacciones iniciales de la glucólisis.

La glucólisis comienza con la unión del azúcar con un grupo fosfato (paso 1, fig. 3-24) a expensas de una molécula de ATP. El uso de ATP en esta etapa puede considerarse una inversión energética: el costo de entrar al proceso de oxidación de la glucosa. La fosforilación activa al azúcar y la vuelve capaz de participar en las reacciones subsiguientes en las que los grupos fosfato se mueven y transfieren a otros receptores. La fosforilación también atenúa la concentración citoplásmica de glucosa, lo cual promueve la difusión continua del azúcar desde la sangre hacia la célula. La glucosa 6-fosfato se convierte en fructosa 6-fosfato y luego en fructosa 1,6-difosfato en detrimento de una segunda molécula de ATP (pasos 2, 3). El difosfato de seis car-

bonos se divide en dos monofosfatos de tres carbonos (paso 4), lo que establece las condiciones para la primera reacción exergónica con la cual puede unirse la formación de ATP. Ahora se analiza la formación de ATP.

El ATP se forma de dos maneras distintas, ambas ilustradas por una reacción química de la glucólisis: la conversión de gliceraldehído 3-fosfato en 3-fosfoglicerato (pasos 6, 7). La reacción general es una oxidación de un aldehído en un ácido carboxílico (como en la figura 3-23) y ocurre en dos pasos catalizados por dos enzimas diferentes (fig. 3-24). La primera de estas enzimas requiere un cofactor no proteico (una coenzima), llamado nicotinaminodinucleótido (NAD) para catalizar la reacción. Como resulta evidente en este y en los siguientes capítulos, el NAD tiene un papel clave en el metabolismo energético porque acepta y dona electrones. La primera reacción (fig. 3-26*a*, *b*) es una oxidación-reducción en la que dos electrones y un protón (equivalente a un ion hidruro, :H$^-$) se transfieren del gliceraldehído 3-fosfato (que se oxida) al NAD$^+$ (que se reduce). La forma reducida de la coenzima es NADH (fig. 3-27). Una enzima que cataliza este tipo de reacción se conoce

SH
Enzima
NAD$^+$
+
H
C=O
HCOH
$CH_2OPO_3^{2-}$
Gliceraldehído 3-fosfato
Unión del sustrato con la enzima
Oxidación del aldehído por transferencia de un protón y un par de electrones a NAD$^+$
Liberación de NADH por intercambio con NAD$^+$
NAD:H
+ H$^+$
Acilo de enzima (enlace covalente)
(*a*)
Ataque del P_i a la enzima acilada
P_i
Acilo de enzima
1,3-difosfoglicerato
(*b*)
Fosforilación a nivel de sustrato
+ ADP
+ ATP
3-fosfoglicerato
(*c*)

FIGURA 3-26 Transferencia de energía durante una oxidación química. La oxidación del gliceraldehído 3-fosfato a 3-fosfoglicerato, que es un ejemplo de la oxidación de un aldehído a un ácido carboxílico, ocurre en dos pasos catalizados por dos enzimas. *a*) y *b*) La primera reacción la cataliza la enzima deshidrogenasa de gliceraldehído 3-fosfato, que transfiere un par de electrones del sustrato a NAD$^+$. Una vez que se reducen, las moléculas de NADH son desplazadas por moléculas de NAD$^+$ provenientes del citosol. *c*) La segunda reacción, que cataliza la enzima cinasa de fosfoglicerato, es un ejemplo de la fosforilación al nivel de sustrato en la que se transfiere un grupo fosfato de una molécula de sustrato, en este caso 1,3-difosfoglicerato, al ADP para formar ATP.

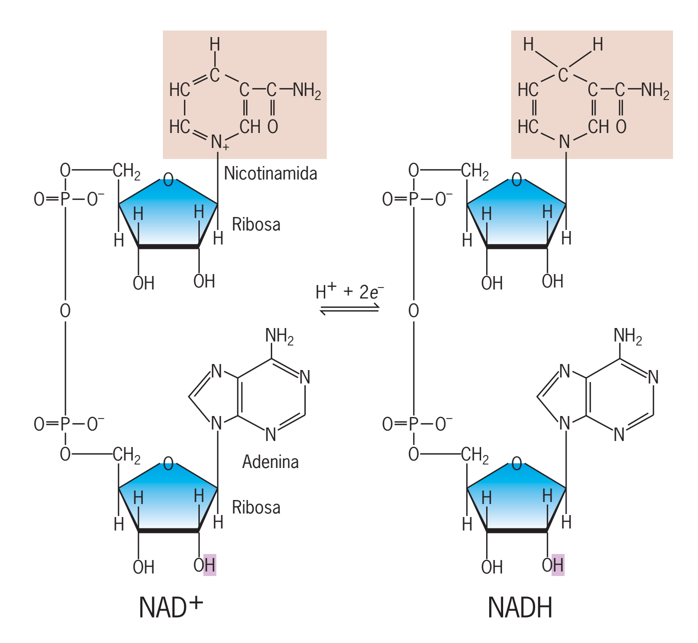


FIGURA 3-27 La estructura del NAD^+ y su reducción a NADH. Cuando el 2′ OH de la fracción ribosa (indicada por la sombra púrpura) forma un enlace covalente con un grupo fosfato, la molécula es $NADP^+$/NADPH, cuya función se describe más adelante en este capítulo.

como **deshidrogenasa**; la enzima que cataliza la reacción previa es *gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa*. La molécula NAD^+, que proviene de la vitamina niacina, actúa como coenzima unida con poca firmeza a la deshidrogenasa en posición para aceptar el ion hidruro (es decir, ambos electrones y el protón). El NADH que se forma en la reacción se libera luego de la enzima a cambio de una molécula nueva de NAD^+.

Antes de analizar esta reacción, primero hay que continuar con las consecuencias de la formación del NADH. El NADH se considera un compuesto de alta energía por la facilidad con la que puede transferir electrones a otras moléculas atrayentes de electrones. (Se dice que el NADH tiene un alto potencial de transferencia de electrones en relación con otros aceptores de electrones de la célula; véase cuadro 5-1). Los electrones casi siempre se transfieren del NADH a través de varios portadores de electrones incluidos en la membrana que constituyen una *cadena transportadora de electrones*. Conforme los electrones se desplazan a lo largo de esta cadena, se mueven a un estado con menor energía libre cada vez y al final se pasan al oxígeno molecular, con lo que éste se reduce en agua. La energía liberada durante el transporte de electrones se utiliza para formar ATP por un proceso llamado *fosforilación oxidativa*. El transporte de electrones y la fosforilación oxidativa se exploran con detalle en el capítulo 5.

Además de la vía indirecta para la formación de ATP que incluye al NADH y una cadena transportadora de electrones, la conversión de gliceraldehído 3-fosfato en 3-fosfoglicerato incluye una vía directa para la formación de ATP. En el segundo paso de esta reacción total (paso 7, figuras 3-24 y 3-26*c*), un grupo fosfato se transfiere del 1,3-difosfoglicerato al ADP para formar una molécula de ATP. La reacción está catalizada por la enzima *fosfoglicerato cinasa*. Esta vía directa para la formación de ATP se conoce como **fosforilación a nivel del sustrato** porque ocurre por la transferencia de un grupo fosfato de uno de los sustratos (en este caso, 1,3-difosfoglicerato) al ADP. Las reacciones restantes de la glucólisis (pasos 8 a 10), que incluyen una segunda fosforilación a nivel del sustrato del ADP (paso 10), están indicadas en la figura 3-24.

La fosforilación a nivel del sustrato de ADP ilustra un punto importante sobre el ATP. Su formación no es tan endergónica. En otras palabras, el ATP no es una molécula tan energética que no pueda formarse con facilidad mediante reacciones metabólicas. Hay muchas moléculas fosforiladas cuya hidrólisis tiene una $\Delta G°'$ más negativa que la del ATP. La figura 3-28 ilustra las $\Delta G°'$ relativas para la hidrólisis de varios compuestos fosforilados. Cualquier donante más alto en la escala puede usarse para fosforilar cualquier molécula que ocupe un sitio más bajo en la escala y la $\Delta G°'$ de esta reacción es igual a la diferencia entre los dos valores presentados en la figura. Por ejemplo, la $\Delta G°'$ para la transferencia de un grupo fosfato del 1,3-difosfoglicerato a ADP para formar ATP es igual a –4.5 kcal/mol (–11.8 kcal/mol + 7.3 kcal/mol). Este concepto de **potencial de transferencia** sirve para comparar cualquier serie de donante y receptores, sin importar cuál sea el grupo que se transfiera, ya sean protones, electrones, oxígeno o grupos fosfato. Las moléculas que ocupan un sitio más alto en la escala, es decir, las que tienen mayor energía libre (mayor $-\Delta G°'$) son moléculas con menor afinidad por el grupo que se transfiere que las que ocupan un sitio más bajo

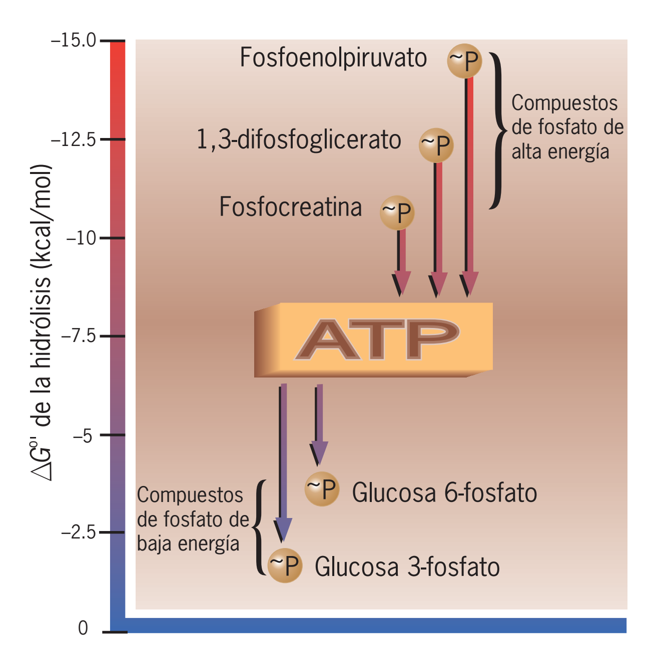


FIGURA 3-28 Acomodo de los compuestos por su potencial de transferencia de fosfato. Los compuestos fosforilados que ocupan un sitio más alto en la escala (aquellos con $\Delta G°'$ de hidrólisis más negativa) tienen la menor afinidad por su grupo fosfato que los compuestos que ocupan un sitio más bajo en la escala. Como resultado, los compuestos más altos de la escala transfieren con facilidad su grupo fosfato para formar compuestos que están más bajos en la escala. De esta manera, los grupos fosfato pueden transferirse del 1,3-difosfato o fosfoenolpiruvato al ADP durante la glucólisis.

en la escala. Mientras menor sea la afinidad, mejor es el donante; mientras mayor sea la afinidad, mejor es el receptor.

Una característica importante de la glucólisis es que puede generar un número limitado de moléculas de ATP, incluso en ausencia de oxígeno. Ni la fosforilación a nivel de sustrato del ADP por 1,3-difosfoglicerato ni una reacción ulterior por el fosfoenolpiruvato (paso 10, fig. 3-24) requieren oxígeno molecular. Por lo tanto, la glucólisis puede considerarse una **vía anaerobia** para la producción de ATP, lo que indica que puede proceder en ausencia de oxígeno molecular para continuar la provisión de ATP. Se producen dos moléculas de ATP por fosforilación al nivel del sustrato durante la glucólisis de cada molécula de gliceraldehído 3-fosfato que se oxide hasta piruvato. Dado que cada molécula de glucosa produce dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato, se generan cuatro moléculas de ATP por cada molécula de glucosa oxidada hasta piruvato. Por otro lado, deben hidrolizarse dos moléculas de ATP para iniciar la glucólisis, lo que deja un beneficio neto para la célula de dos moléculas de ATP por cada glucosa oxidada. La ecuación real para las reacciones de la glucólisis puede escribirse como sigue:

$$\text{Glucosa} + 2\ \text{ADP} + 2\ P_i + 2\ NAD^+ \rightarrow$$
$$2\ \text{piruvato} + 2\ \text{ATP} + 2\ \text{NADH} + 2\ H^+ + 2\ H_2O$$

El piruvato, producto terminal de la glucólisis, es un compuesto clave porque está en la unión de las vías anaeróbica (independiente de oxígeno) y aeróbica (dependiente de oxígeno). En ausencia de oxígeno molecular, el piruvato se somete a fermentación, como se describe en la sección siguiente. Cuando existe oxígeno disponible, el piruvato se cataboliza aún más por la respiración aeróbica, como se analiza en el capítulo 5.

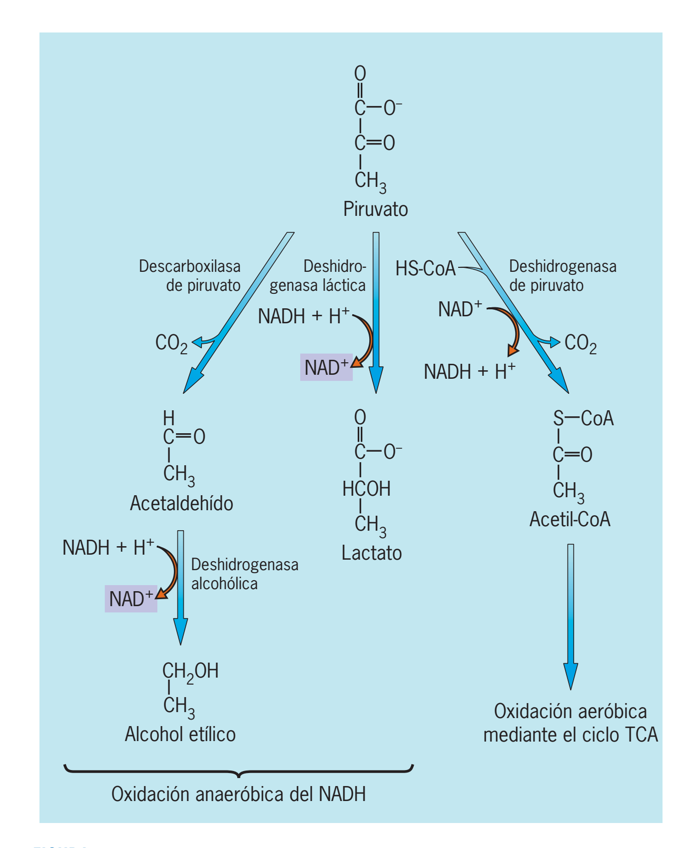


FIGURA 3-29 Fermentación. La mayoría de las células lleva a cabo respiración aeróbica, la cual depende del oxígeno molecular. Si los suministros de oxígeno disminuyen, como sucede en una célula de músculo esquelético que realiza una contracción extenuante o una célula de levadura que vive en condiciones anaeróbicas, estas células son capaces de regenerar el NAD^+ mediante la fermentación. Las células musculares realizan la fermentación a través de la formación de lactato, en tanto que las células de levaduras lo hacen con la formación de etanol. La oxidación aeróbica del piruvato en el ciclo del ácido tricarboxílico se describe con detalle en el capítulo 5.

Oxidación anaeróbica del piruvato: el proceso de fermentación Ya se describió que la glucólisis puede proporcionar a la célula una pequeña cantidad real de ATP por cada molécula de glucosa que se convierte en piruvato. Sin embargo, las reacciones glucolíticas ocurren a velocidades tan altas que la célula puede producir una cantidad significativa de ATP si utiliza esta vía. De hecho, diversas células, incluidas las levaduras, células tumorales y células musculares, dependen en buena medida de la glucólisis como medio para la formación de ATP. Pese a ello, existe un problema que estas células deben enfrentar. Uno de los productos de la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato es el NADH. La formación de NADH ocurre a expensas de uno de los reactivos, NAD^+, que es poco abundante en las células. Como NAD^+ es un reactivo necesario en este paso importante de la glucólisis, debe regenerarse a partir del NADH. De lo contrario, ya no podría ocurrir la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato ni tampoco las reacciones subsiguientes de la glucólisis. No obstante, sin oxígeno el NADH no puede oxidarse a NAD^+ mediante una cadena de transporte de electrones porque el oxígeno es el aceptor final de la cadena. Empero, las células pueden regenerar el NAD^+ mediante la **fermentación**, la transferencia de los electrones del NADH al piruvato, el producto final de la glucólisis o un compuesto derivado del piruvato (fig. 3-29). Al igual que la glucólisis, la fermentación ocurre en el citosol de una célula eucariota. Para la mayoría de los organismos que dependen del oxígeno, la fermentación es una medida sustituta para regenerar el NAD^+ cuando los niveles de oxígeno son bajos, de manera que la glucólisis pueda continuar y se mantenga la producción de ATP.

El producto de la fermentación varía de un tipo de célula u organismo a otro. Cuando es necesario que las células musculares se contraigan en forma repetida, el nivel de oxígeno baja mucho para mantener el nivel de las demandas metabólicas de la célula. En estas condiciones, las células del músculo esquelético regeneran NAD^+ mediante la conversión de piruvato en lactato. Cuando el oxígeno está disponible de nuevo en cantidades suficientes, el lactato puede convertirse de nueva cuenta en piruvato para que continúe la oxidación. Las células de levaduras enfrentaron los retos de la vida anaerobia con una solución metabólica distinta: convierten el piruvato en etanol (fig. 3-29).

Aunque la fermentación es un adjunto necesario para el metabolismo de muchos organismos y es la única fuente de energía metabólica en algunos anaerobios, la energía obtenida por la glucólisis sola es escasa en comparación con la oxidación completa de la glucosa hasta dióxido de carbono y agua. Cuando un mol de glucosa se oxida por completo, se liberan 686 kilocalorías. En cambio, sólo se liberan 57 kilocalorías cuando esta misma cantidad de glucosa se convierte en etanol en condicio-

nes estándar y apenas se liberan 47 kilocalorías si se convierte en lactato. De cualquier manera, sólo se forman dos moléculas de ATP por cada glucosa oxidada mediante glucólisis y fermentación; más de 90% de esta energía se descarta tan sólo en el producto de la fermentación (como lo demuestra la inflamabilidad del alcohol etílico).

Durante las etapas iniciales de la vida en la Tierra, cuando aún no aparecía el oxígeno, es probable que la glucólisis y la fermentación fueran las principales vías metabólicas por las que las células procariotas primitivas extraían energía de los azúcares. Después de la aparición de las cianobacterias, el oxígeno de la atmósfera aumentó en forma drástica y se hizo posible la evolución de una forma metabólica aeróbica. Como resultado, los productos de la glucólisis podían oxidarse por completo y obtenerse mucho más ATP. En el capítulo 5 se describe la manera en que se logra esto, cuando se trate la estructura y la función de la mitocondria.

Poder reductor La energía necesaria para sintetizar moléculas biológicas complejas, como las proteínas, grasas y ácidos nucleicos, se obtiene sobre todo del ATP generado por la glucólisis y el transporte de electrones. No obstante, muchos de estos materiales, en especial las grasas y otros lípidos, están más reducidos que los metabolitos a partir de los cuales se forman. La síntesis de lípidos requiere la reducción de los metabolitos, que se consigue por la transferencia de electrones de alta energía del NADPH, un compuesto de estructura similar al NADH, pero que contiene un grupo fosfato adicional (descrito en el pie de la figura 3-27). Un reservorio celular de NADPH representa su **poder reductor**, que es una medida importante del contenido de energía utilizable de la célula. El uso de NADPH puede ilustrarse con una de las reacciones clave de la fotosíntesis:

$$\begin{array}{c} O \\ \| \\ C{-}OPO_3^{2-} \\ | \\ HC{-}OH \\ | \\ CH_2OPO_3^{2-} \end{array} + NADPH \rightarrow \begin{array}{c} O \\ \| \\ CH \\ | \\ HC{-}OH \\ | \\ CH_2OPO_3^{2-} \end{array} + NADP^+ + P_i$$

1,3-difosfoglicerato — Gliceraldehído 3-fosfato

En esta reacción, un par de electrones (junto con un protón) se transfiere del NADPH al sustrato 1,3-difosfoglicerato, con lo que se reduce un átomo de carbono (indicado en rojo).

La forma oxidada de NADPH, $NADP^+$, se forma a partir de NAD^+ en la reacción siguiente:

$$NAD^+ + ATP \rightleftharpoons NADP^+ + ADP$$

Por lo tanto, el NADPH puede formarse por la reducción de $NADP^+$. Al igual que el NADH, el NADPH es un compuesto de alta energía por su gran potencial para transferencia de electrones. La transferencia de energía libre en forma de estos electrones eleva al receptor a un estado más reducido y energético.

La separación del poder reductor en dos moléculas distintas, pero relacionadas, NADH y NADPH, refleja una separación de sus papeles metabólicos principales. El NADH y el NADPH se reconocen como coenzimas para enzimas diferentes. Las enzimas que tienen una función reductora en las vías anabólicas reconocen al NADPH como su coenzima, mientras que las enzimas que actúan como deshidrogenasas en las vías catabólicas reconocen al NAD^+. Aunque se usan de manera diferente, una coenzima puede reducir a la otra en la reacción siguiente, catalizada por la enzima *transhidrogenasa*

$$NADH + NADP^+ \rightleftharpoons NAD^+ + NADPH$$

Cuando la energía es abundante, se favorece la producción de NADPH, lo que aporta el suministro de electrones necesarios para la biosíntesis de nuevas macromoléculas esenciales para el crecimiento. Sin embargo, cuando los recursos energéticos son escasos, la mayoría de los electrones de alta energía del NADH se "cobran" para producir ATP y sólo se genera el NADPH suficiente para cubrir los requerimientos biosintéticos mínimos de la célula.

Regulación metabólica

La cantidad de ATP presente en una célula en un momento determinado es sorprendentemente pequeña. Por ejemplo, una célula bacteriana contiene cerca de un millón de moléculas de ATP, cuya vida media es muy corta (alrededor de uno o dos segundos). Con un suministro tan limitado, resulta evidente que el ATP no es una molécula en la que se almacene una gran cantidad de energía libre. Las reservas energéticas de una célula se almacenan como polisacáridos y grasas. Cuando los niveles de ATP empiezan a disminuir, se activan las reacciones para aumentar la síntesis de ATP a expensas de las formas de almacenamiento ricas en energía. De igual manera, cuando los niveles de ATP son altos, se inhiben las reacciones para su producción. La célula regula estas importantes reacciones liberadoras de energía mediante el control de ciertas enzimas esenciales en varias vías metabólicas.

La función de una proteína se relaciona de forma notoria con su estructura (conformación). Por lo tanto, no es sorprendente que las células regulen la actividad de las proteínas mediante la modificación de la conformación de las moléculas clave de la proteína. En el caso de las enzimas, la regulación de la actividad catalítica se enfoca en la modificación de la estructura del sitio activo. Dos mecanismos frecuentes para alternar la forma del sitio activo de una enzima son la modificación covalente y la modulación alostérica y ambas tienen papeles relevantes en la regulación de la oxidación de la glucosa.[4]

Alteración de la actividad enzimática mediante la modificación covalente A mediados de la década de 1950, Edmond Fischer y Edwin Krebs de la *University of Washington* estudiaban la fosforilasa, una enzima que se encuentra en los músculos y separa al glucógeno en subunidades de glucosa. La enzima podía existir en estado activo o inactivo. Fischer y Krebs prepararon

[4] El metabolismo también se regula mediante el control de las concentraciones de enzimas. Las velocidades relativas con las que se sintetizan y degradan las enzimas se consideran en capítulos posteriores.

un extracto crudo de células musculares y encontraron que las moléculas inactivas de la enzima del extracto podían activarse con la mera adición de ATP al tubo de ensayo. El análisis adicional reveló una segunda enzima en el extracto, una "enzima convertidora", como la denominaron, que transfería un grupo fosfato del ATP a uno de los 841 aminoácidos que forman la molécula de fosforilasa. La presencia del grupo fosfato alteró la forma del sitio activo de la molécula enzimática y aumentó su actividad catalítica.

Una investigación posterior mostró que la modificación covalente de las enzimas, como se ilustra con la adición (o eliminación) de fosfatos, es un mecanismo general para cambiar la actividad de las enzimas. Las enzimas que transfieren grupos fosfato a otras proteínas se llaman **cinasas de proteína** y regulan actividades tan diversas como la acción hormonal, la división celular y la expresión genética. Más tarde, la "enzima convertidora" que descubrieron Krebs y Fischer se llamó cinasa de fosforilasa y su regulación se discute en la sección 15.3. Hay dos tipos básicos diferentes de cinasas de proteína: un tipo agrega grupos fosfato a residuos específicos de tirosina en una proteína sustrato; el otro tipo agrega fosfatos a residuos específicos de serina o treonina en el sustrato. La importancia de las cinasas de proteína se refleja por el hecho de que cerca de 2% de todos los genes de una célula de levadura (113 de casi 6 200) codifica a miembros de este tipo de enzimas.

Alteración de la actividad enzimática mediante modulación alostérica La **modulación alostérica** es un mecanismo por el cual se inhibe o estimula la actividad de una enzima por un compuesto que se une a un sitio, llamado **sitio alostérico**, el cual está en un sitio diferente respecto del punto activo de la enzima. Al igual que el colapso en secuencia de una fila de fichas de dominó, la unión de un compuesto con el sitio alostérico inicia una "ola" que se expande por toda la proteína y provoca un cambio definido en la forma del sitio activo, el cual puede localizarse en el lado contrario de la enzima, incluso en un polipéptido distinto dentro de la molécula de proteína. Según sean la enzima y el modulador alostérico particulares, el cambio de la forma del sitio activo puede estimular o inhibir su capacidad para catalizar la reacción. La modulación alostérica ilustra la relación íntima entre la estructura molecular y la función. Los cambios muy pequeños de la estructura de la enzima inducidos por el modulador alostérico pueden ocasionar cambios marcados en la actividad enzimática.

Las células son plantas manufactureras muy eficientes que no desperdician energía y materiales en la producción de compuestos que no utilizan. Uno de los principales mecanismos que usan las células para cerrar líneas de ensamble anabólico es un tipo de modulación alostérica llamado **inhibición por retroalimentación**, en el que la enzima que cataliza el primer paso de una vía metabólica se desactiva por un tiempo cuando se alcanza cierta concentración del producto final de esa vía, un aminoácido por ejemplo. Esto se ilustra por la sencilla vía que se muestra en la figura 3-30 en la que dos sustratos, A y B, se convierten en el producto final E. A medida que aumenta la concentración del producto E, se une con el sitio alostérico de la enzima BC, lo que induce un cambio en la conformación del sitio activo que disminuye la actividad de la enzima. La inhibición por retroalimentación ejerce un control sensible e inmediato sobre la actividad anabólica de una célula.

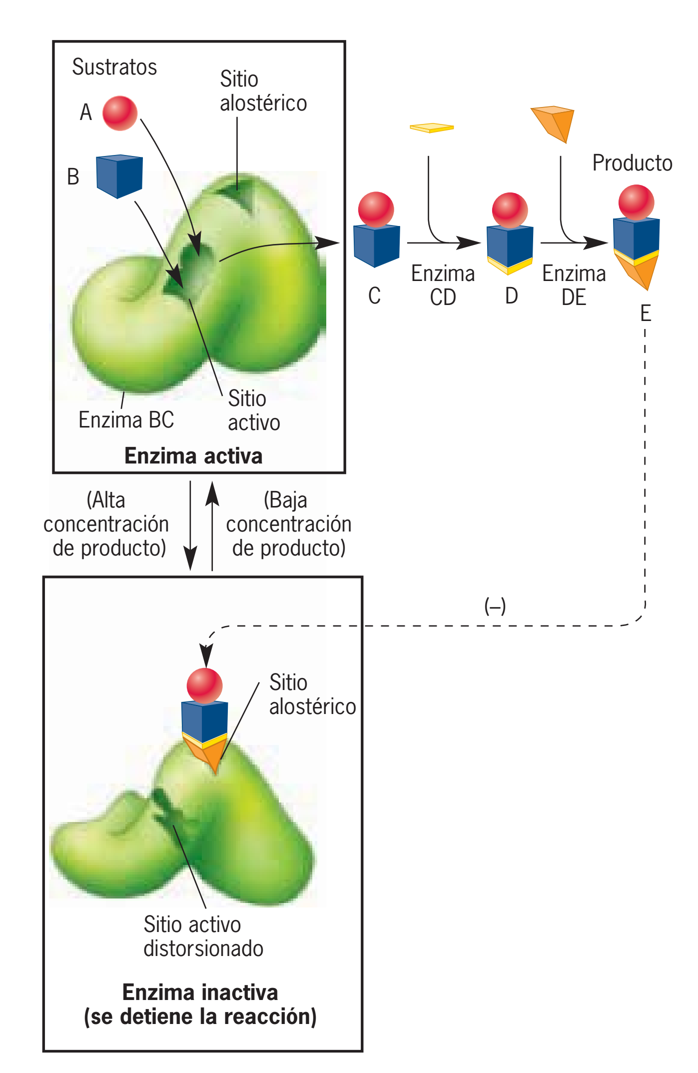


FIGURA 3-30 **Inhibición por retroalimentación.** El flujo de metabolitos a través de una vía metabólica se detiene cuando la primera enzima de la vía (enzima BC) se inhibe por efecto del producto final de esa vía (compuesto E), el cual se une en el sitio alostérico de la enzima. La inhibición por retroalimentación impide que una célula desperdicie recursos en la producción continua de compuestos que ya no son necesarios.

Separación de vías catabólicas y anabólicas Una breve consideración de la vía anabólica que conduce a la síntesis de glucosa (**gluconeogénesis**), permite ilustrar algunos aspectos importantes de las vías sintéticas. Casi todas las células son capaces de sintetizar glucosa a partir de piruvato al mismo tiempo que oxidan la glucosa como su principal fuente de energía química. ¿Cómo es que las células pueden emplear estas dos vías opuestas? El primer punto importante es que, aunque las enzimas pueden catalizar una reacción en ambos sentidos, las reacciones de la gluconeogénesis no pueden producirse con la simple inversión de las reacciones de la glucólisis. La vía glucolítica contiene tres reacciones irreversibles desde el punto de vista termodinámico (fig. 3-25) y de alguna manera deben tomarse desviaciones para estos pasos. Aun cuando todas las reacciones de la glucólisis pudieran revertirse, sería para la célula una mane-

ra muy inconveniente de controlar sus actividades metabólicas, ya que las dos vías no podrían controlarse en forma independiente una de la otra. Por lo tanto, la célula no puede detener la síntesis de glucosa y activar la degradación de la glucosa porque las mismas enzimas estarían activas en ambos sentidos.

Si se compara la vía por la que se degrada la glucosa con la vía sintética de la glucosa, resulta evidente que algunas reacciones son idénticas, aunque avanzan en sentido contrario, mientras que otras son muy diferentes (pasos 1 a 3, fig. 3-31). Al usar enzimas diferentes para catalizar las diversas reacciones clave en las dos vías opuestas, una célula puede resolver los problemas termodinámicos y los reguladores inherentes a la capacidad para degradar y producir las mismas moléculas.

Esto se puede comprender mejor si se observan con más cuidado las enzimas esenciales de la glucólisis y la gluconeogénesis. Como se indica en el paso 2 de la figura 3-31, la *fosfofructocinasa*, una enzima de la glucólisis, cataliza la reacción siguiente:

$$\text{Fructosa 6-fosfato} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{fructosa 1,6-difosfato} + \text{ADP}$$

que tiene una $\Delta G°'$ de −3.4 kcal/mol, lo que la vuelve irreversible. La reacción tiene una $\Delta G°'$ negativa tan grande porque se une con la hidrólisis del ATP. En la gluconeogénesis, la enzima *fructosa 1,6-difosfatasa* cataliza la formación de fructosa 6-fosfato mediante una simple hidrólisis:

$$\text{Fructosa 1,6-difosfato} + H_2O \rightleftharpoons \text{fructosa 6-fosfato} + P_i \qquad \Delta G°' = -3.9 \text{ kcal/mol}$$

Las enzimas particulares de la glucólisis y la gluconeogénesis descritas antes son las enzimas reguladoras clave de sus respectivas vías. Estas enzimas son reguladas en parte por AMP y ATP. Debe tenerse presente que la concentración de AMP dentro de las células es inversamente proporcional a la concentración de ATP; cuando las concentraciones de ATP son bajas, las de AMP son altas, y viceversa. De este modo, los valores elevados de AMP indican a una célula que sus reservas de combustible de ATP están agotándose. Aunque el ATP es un sustrato de la fosfofructocinasa, el ATP también es un inhibidor alostérico, en tanto que el AMP es un activador alostérico. Cuando los niveles de ATP son altos, la actividad de la enzima disminuye tanto que no se forma más ATP mediante glucólisis. Por el contrario, cuando los niveles de ADP y AMP son altos en relación con el ATP, la actividad de la enzima aumenta, lo cual fomenta la producción de ATP. En cambio, la actividad de la fructosa 1,6-difosfatasa, una enzima esencial en la gluconeogénesis, se inhibe con los niveles elevados del AMP.

La importancia de la modulación alostérica en el control metabólico es ilustrada por estudios recientes sobre la enzima proteincinasa activada por AMP (o simplemente AMPK). Al igual que la fosforilasa de glucógeno antes descrita, la AMPK controla la actividad de otras enzimas agregando grupos fosfato a residuos serina o treonina específicos dentro de su estructura. La AMPK es regulada alostéricamente por AMP. Cuando las concentraciones de éste aumentan, se activa la AMPK, que entonces fosforila e inhibe enzimas clave implicadas en vías anabólicas al mismo tiempo que fosforila y activa enzimas clave de las vías catabólicas. El resultado final de la activación de la AMPK es un decremento en la actividad de las vías que consumen ATP y un incremento en la actividad de las vías que producen ATP, lo cual hace que aumente la concentración de ATP en la célula. La AMPK interviene no sólo en la regulación de la energía celular sino, al menos en mamíferos, en la regulación del balance energético de todo el cuerpo. En los mamíferos, el apetito es controlado por centros del hipotálamo que reaccionan a las concentraciones de determinados nutrimentos y hormonas en la sangre. Un descenso en los valores de glucosa sanguínea (glucemia), por ejemplo, actúa en el hipotálamo estimulando el apetito, lo que al parecer es mediado por la activación de la AMPK en células nerviosas hipotalámicas. A la inversa, se supone que la sensación de estar "lleno" que experimentamos después de una comida es desencadenada por determinadas hormonas (p. ej., leptina secretada por células adiposas) que inhiben la actividad de la AMPK en estas mismas células encefálicas.

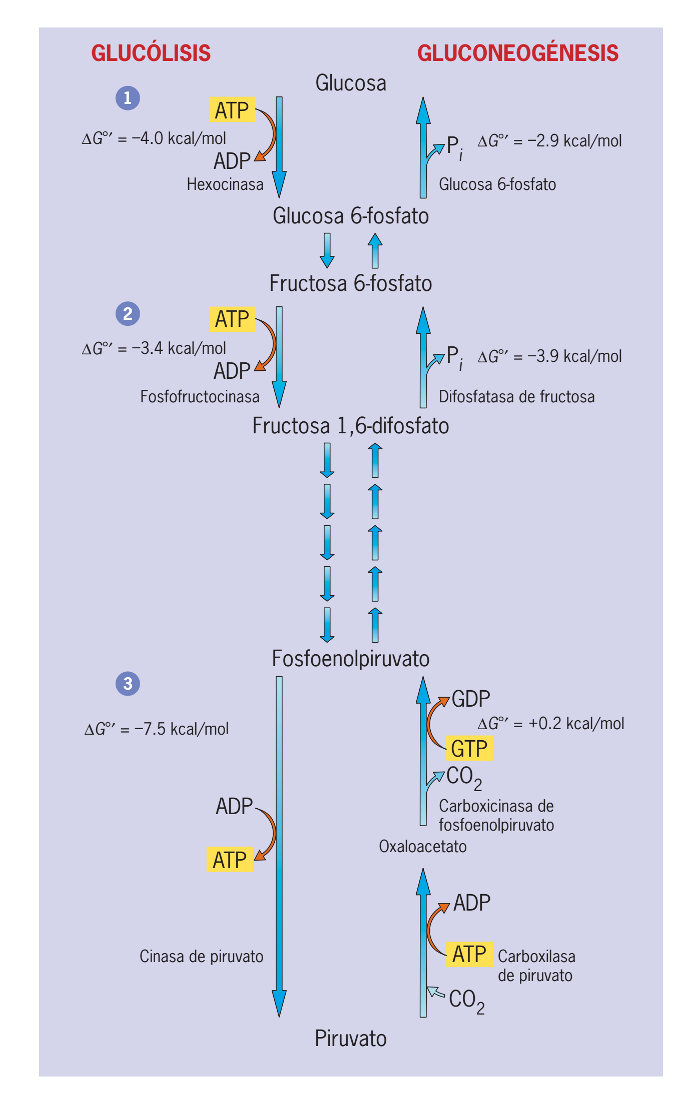


FIGURA 3-31 Glucólisis *vs.* gluconeogénesis. Mientras que casi todas las reacciones son las mismas en ambas vías, aunque avancen en sentidos opuestos, las tres reacciones irreversibles de la glucólisis (pasos 1 a 3 aquí) se sustituyen en la vía glucogénica por reacciones diferentes favorecidas desde el punto de vista termodinámico.

REVISIÓN ?

1. ¿Por qué las vías catabólicas se describen como convergentes, mientras que las anabólicas como divergentes?
2. Compare la energía obtenida por una célula que oxida glucosa en forma anaeróbica y aeróbica. ¿Cuál es la diferencia en los productos terminales de estos dos tipos de metabolismo?
3. Explique el significado del potencial de transferencia de fosfato. ¿De qué manera se compara el potencial de transferencia de fosfato del fosfoenolpiruvato con el del ATP?, ¿qué significado termodinámico tiene esto (en cuanto a la $\Delta G^{\circ\prime}$ relativa de la hidrólisis)?, ¿qué significa en términos de afinidad por los grupos fosfato?
4. ¿Por qué el poder reductor se considera una forma de energía?
5. En la reacción en la que el gliceraldehído 3-fosfato se oxida en 3-fosfoglicerato, ¿qué compuesto actúa como agente reductor y cuál como agente oxidante?, ¿qué compuesto se oxida?, ¿cuál se reduce?
6. ¿Qué reacciones de la glucólisis se unen con la hidrólisis del ATP?, ¿cuáles implican fosforilación al nivel del sustrato?, ¿cuáles dependen de la fermentación o respiración aeróbica para continuar?

SINOPSIS

La energía es la capacidad para realizar trabajo. La energía puede tener varias formas, incluidas química, mecánica, lumínica, eléctrica y térmica, que pueden convertirse unas en otras. Siempre que se intercambia energía, la cantidad total de energía en el universo permanece constante, pero existe una pérdida de energía libre, la energía disponible para realizar trabajo adicional. La energía utilizable que se pierde en entropía se debe al aumento de la aleatoriedad y desorden del universo. Los organismos vivos son sistemas con baja entropía, estado que se mantiene por el ingreso constante de energía externa que proviene del sol (pág. 86).

Todas las transformaciones espontáneas de energía (exergónicas) transcurren de un estado con alto nivel de energía libre a un estado con menor energía libre; la ΔG debe ser negativa. En una reacción química, ΔG es equivalente a la diferencia en el contenido de energía libre entre reactivos y productos. Mientras mayor sea la ΔG, más lejos está la reacción del equilibrio. Conforme avanza la reacción, ΔG disminuye y llega a cero en el equilibrio. Para comparar los cambios energéticos durante las diferentes reacciones químicas, se determinan las diferencias de energía libre entre los reactivos y los productos para un conjunto de condiciones estándar y se señalan como $\Delta G^{\circ\prime}$, así $\Delta G^{\circ\prime} = -2.303\ RT \log K'_{eq}$. Las reacciones que tienen constantes de equilibrio mayores de uno tienen valores $\Delta G^{\circ\prime}$ negativos. Debe tenerse presente que $\Delta G^{\circ\prime}$ es un valor fijo que describe la dirección en la que una reacción procede cuando la mezcla de reacción está en condiciones estándar. No tiene valor para identificar la dirección de una reacción en un momento particular en la célula; esto está regulado por ΔG, que depende de las concentraciones de reactivos y productos en el momento. Las reacciones que tienen valores positivos de $\Delta G^{\circ\prime}$ (como la reacción en la que el fosfato de dihidroxiacetona se convierte en gliceraldehído 3-fosfato) pueden ocurrir en la célula porque el índice entre reactivos y productos se mantiene en un valor mayor al esperado por la K'_{eq} (pág. 87).

La hidrólisis del ATP es una reacción muy favorable ($\Delta G^{\circ\prime} = -7.3$ kcal/mol) y puede usarse para impulsar reacciones que de lo contrario serían desfavorables. El uso de la hidrólisis del ATP para impulsar las reacciones desfavorables se ilustra con la síntesis de glutamina a partir de ácido glutámico y NH_3 ($\Delta G^{\circ\prime} = +3.4$ kcal/mol). La reacción se promueve por la formación de un intermediario común, el fosfato de glutamilo. La hidrólisis del ATP puede tener un papel en tales procesos porque la célula mantiene un índice [ATP]/[ADP] elevado, mucho mayor al equilibrio, lo cual ilustra que el metabolismo celular opera en condiciones de falta de equilibrio. Esto no significa que todas las reacciones se mantengan alejadas del equilibrio, sino que ciertas reacciones clave en una vía metabólica tienen lugar con valores negativos altos de ΔG, lo cual las hace irreversibles dentro de la célula y les permite impulsar toda la vía. Las concentraciones de reactivos y productos pueden mantenerse en valores relativamente constantes de desequilibrio (estado estable) dentro de la célula porque los materiales fluyen de modo continuo del medio externo al interior de la célula y los productos de desecho se eliminan en forma constante (pág. 90).

Las enzimas son proteínas que incrementan en grado notorio la velocidad de reacciones químicas específicas mediante su unión con el (los) reactivo(s) y elevan la probabilidad de que se conviertan en productos. Al igual que todos los catalizadores reales, las enzimas están presentes en pequeñas cantidades; no sufren cambios irreversibles durante la reacción y no tienen efecto en la termodinámica de la reacción. Por lo tanto, las enzimas no pueden hacer que una reacción desfavorable (una con ΔG positiva) proceda en sentido directo ni pueden cambiar el índice entre productos y reactivos en equilibrio. Como catalizadores, las enzimas sólo pueden acelerar el ritmo de las reacciones favorables, lo cual hacen en condiciones de temperatura y pH propios de la célula. Las enzimas también se caracterizan por su especificidad hacia los sustratos, catálisis muy eficiente sin productos intermedios indeseables y por la oportunidad de regulación de su actividad catalítica (pág. 94).

Las enzimas actúan mediante la disminución de la energía de activación (E_A), que es la energía cinética que requieren los reactivos para que ocurra la reacción. Como resultado, un porcentaje mucho mayor de moléculas de reactivo tiene la energía necesaria para convertirse en productos en presencia de la enzima. Las enzimas disminuyen la E_A mediante la formación de un complejo enzima-sustrato. La parte de la enzima que se une con el sustrato se llama sitio activo y también contiene las cadenas laterales de aminoácidos o cofactores necesarios, o ambos, para influir en los sustratos y facilitar la transformación química. Entre los mecanismos que facilitan la catálisis, las enzimas son capaces de mantener a los reactantes en la orientación adecuada; pueden hacer que los sustratos sean más reactivos al influir en su carácter electrónico y también ejercer tensión física que debilita ciertos enlaces dentro del sustrato (pág. 95).

El metabolismo es el conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar dentro de la célula. Estas reacciones pueden agruparse en vías metabólicas que contienen una secuencia de reacciones químicas en la

que cada reacción la cataliza una enzima específica. Las vías metabólicas se dividen en dos grandes tipos: vías catabólicas, donde se degradan compuestos y se libera energía, y vías anabólicas, en las que se sintetizan compuestos más complejos con la energía almacenada en la célula. Las macromoléculas de estructura diversa se degradan en las vías catabólicas hasta una cantidad relativamente pequeña de metabolitos de bajo peso molecular que proporcionan las materias primas a partir de las cuales divergen las vías anabólicas. Ambos tipos de vías incluyen reacciones de oxidación-reducción en las que los electrones se transfieren de un sustrato a otro, lo que aumenta el estado de reducción del receptor y aumenta el estado de oxidación del donante (pág. 107).

El estado de reducción de una molécula orgánica, medida por el número de hidrógenos por átomo de carbono, proporciona una medida general del contenido de energía de la molécula. Un mol de glucosa libera 686 kcal cuando se oxida por completo hasta CO_2 y H_2O, mientras que la conversión de un mol de ADP en ATP requiere sólo 7.3 kcal. Por consiguiente, la oxidación de una molécula de glucosa puede producir energía suficiente para generar muchas moléculas de ATP. La primera etapa en el catabolismo de la glucosa es la glucólisis, durante la cual la glucosa se convierte en piruvato con una ganancia neta de dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADH. Las moléculas de ATP se producen por fosforilación al nivel del sustrato y en ella se transfiere un grupo fosfato de un sustrato al ADP. Los NADH se producen por oxidación de un aldehído para formar un ácido carboxílico con la transferencia concomitante de un ion hidruro (un protón y dos electrones) del sustrato a NAD^+. En presencia de oxígeno, la mayoría de las células oxida el NADH mediante una cadena transportadora de electrones, con lo que se obtiene ATP a través de la respiración aeróbica. En ausencia de O_2, el NAD^+ se regenera por fermentación, en la cual se usan los electrones de alta energía del NADH para reducir el piruvato. La regeneración de NAD^+ es precisa para que continúe la glucólisis (pág. 108).

La actividad de una enzima está regulada a menudo por dos mecanismos: modificación covalente y modulación alostérica. La modificación covalente se realiza con mayor frecuencia por la transferencia de un grupo fosfato del ATP a uno o más residuos de serina, treonina o tirosina de la enzima en una reacción catalizada por una cinasa de proteína. Los moduladores alostéricos actúan mediante enlaces no covalentes con un sitio en la enzima alejado del sitio activo. La unión del modulador altera la conformación del sitio activo, aumentando o disminuyendo la actividad catalítica de la enzima. Un ejemplo frecuente de la modulación alostérica es la inhibición por retroalimentación, en la que el producto final de una vía inhibe por efecto alostérico a la primera enzima única de esa vía. El mismo compuesto degradado en una vía catabólica puede servir como producto terminal de una vía anabólica. Por ejemplo, la glucosa se degrada mediante glucólisis y se sintetiza por gluconeogénesis. Aunque las dos vías comparten la mayoría de las enzimas, tres enzimas clave son únicas de cada una, lo que permite a la célula regular las dos vías de manera independiente y resolver lo que de otra manera serían reacciones irreversibles (pág. 114).

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. ¿Cómo esperaría que un descenso del pH afectara a una reacción catalizada por la quimotripsina?, ¿cómo podría afectar un aumento del pH esta reacción?
2. La inhibición por retroalimentación casi siempre altera la actividad de la primera enzima de la vía metabólica, en lugar de alguna de las enzimas siguientes de la misma vía. ¿Por qué es adaptativo?
3. Después de revisar las reacciones de la formación de glutamina en la página 92 explique por qué cada una de las siguientes declaraciones acerca de la tercera reacción (o en general) es verdadera o falsa.
   a) Si la reacción se escribiera a la inversa, su $\Delta G°'$ sería de +3.9 kcal/mol.
   b) Si todos los reactivos y productos estuvieran en condiciones estándar al principio de un experimento, después de cierto periodo el índice $[NH_3]$/[ADP] disminuiría.
   c) Conforme avanza la reacción, la $\Delta G°'$ se aproxima más a cero.
   d) En equilibrio, las reacciones directa e inversa son iguales y el índice [ATP]/[ADP] llega a uno.
   e) En la célula es posible que la glutamina se forme cuando el índice [glutamina]/[ácido glutámico] es mayor de uno.
4. Usted acaba de aislar una nueva enzima y determinó la velocidad de reacción con tres concentraciones diferentes de sustratos. Encuentra que la pendiente de la curva del producto contra el tiempo es la misma para las tres concentraciones. ¿Qué concluiría sobre las condiciones de la mezcla de reacción?
5. La lisozima es una enzima de acción lenta, requiere cerca de dos segundos para catalizar una sola reacción. ¿Cuál es el número de recambio de la lisozima?
6. En la reacción R ⇌ P, si un mol de producto (P) tiene la misma energía libre que un mol de reactivo (R), ¿cuál es el valor de la K'_{eq} de esta reacción?, ¿cuál es el valor de $\Delta G°'$?
7. ¿Qué significa en términos de índices de concentración cuando se dice que la ΔG de la hidrólisis del ATP en la célula es cercana a –12 kcal/mol, mientras que la $\Delta G°'$ es –7.3 kcal/mol?
8. Las enzimas que están bajo la regulación celular son aquellas cuyas reacciones casi siempre se producen en condiciones de desequilibrio. ¿Cuál sería el efecto de la inhibición alostérica de una enzima que opera cerca del equilibrio?
9. En la reacción A ⇌ B, si la K'_{eq} es 10^3, ¿cuál es la $\Delta G°'$?, ¿cuál es la $\Delta G°'$ si se determinó que la K'_{eq} es 10^{-3}?, ¿cuál es la K'_{eq} de la reacción de la hexocinasa indicada en la figura 3-24 (paso 1)?
10. La $\Delta G°'$ de la reacción fosfato de acetilo + ADP ⇌ acetato + ATP es –2.8 kcal/mol. Molécula por molécula, el fosfato de acetilo tiene (mayor, menor, igual) energía libre que el ATP en relación con su compuesto desfosforilado; el ADP tiene (mayor, menor, igual) afinidad por el fosfato que el acetato. (Señale las respuestas correctas.)
11. Si la reacción XA + Y ⇌ XY + A tiene una $\Delta G°'$ de +7.3 kcal/mol, ¿podría esta reacción impulsarse en la célula mediante la unión con la hidrólisis del ATP?, ¿por qué?
12. En una serie de reacciones, A → B → C → D, se determinó que la constante de equilibrio para la segunda reacción (B → C) es 0.1. Usted esperaría que la concentración de C en una célula viva fuera: a) igual a B; b) la décima parte de B; c) menor a la décima parte de B; d) 10 veces mayor que B; e) más de 10 veces mayor que B. (Señale la respuesta correcta.)
13. La reacción del compuesto X con el compuesto Y para producir el compuesto Z es una reacción desfavorable ($\Delta G°' = +5$ kcal/mol). Trace las reacciones químicas que ocurrirían si se utilizara ATP para impulsar la reacción.
14. El ATP evolucionó como la molécula central para el metabolismo energético. ¿Podría el 1,3-difosfoglicerato tener la misma función?, ¿por qué?

15. Calcule la ΔG para la hidrólisis del ATP en una célula en la que el índice [ATP]/[ADP] aumentó hasta 100:1, mientras que la concentración de P_i permaneció en 10 mM. ¿De qué manera se compara esto con el índice de [ATP]/[ADP] cuando la reacción está en equilibrio y la concentración de P_i permanece en 10 mM?, ¿cuál sería el valor de ΔG cuando todos los reactivos y los productos están en condiciones estándar (1 M)?

16. Considere la reacción:

$$\text{Glucosa} + P_i \rightleftharpoons \text{glucosa 6-fosfato} + H_2O \qquad \Delta G^{\circ\prime} = +3 \text{ kcal/mol}$$

¿Cuál es la constante de equilibrio, K'_{eq}, para esta reacción? (*Nota:* se ignora la concentración de agua.) ¿La $\Delta G^{\circ\prime}$ positiva de la reacción previa significa que la reacción nunca puede proceder en forma espontánea de izquierda a derecha?

17. En condiciones fisiológicas, [glucosa] = 5 mM, [glucosa 6-fosfato] = 83 mM y [P_i] = 1 mM. En estas condiciones, ¿la reacción del problema 16 procedería en forma espontánea de izquierda a derecha? Si no es así, ¿cuál sería la concentración de glucosa necesaria para que la reacción avanzara de izquierda a derecha, si las concentraciones de los otros reactivos y productos son las mencionadas antes?

18. Considere la reacción:

$$\text{Glutamato} + \text{amoniaco} \rightleftharpoons \text{glutamina} + H_2O \qquad \Delta G^{\circ\prime} = +3.4 \text{ kcal/mol}$$

Si la concentración de amoniaco es 10 mM, ¿cuál sería el índice glutamato/glutamina necesario para que la reacción procediera en forma espontánea de izquierda a derecha a 25°C?

19. Debe quedar claro que la síntesis de glutamina no puede ocurrir en una célula mediante la reacción descrita en el problema 18. La reacción real une la síntesis de glutamina con la hidrólisis del ATP:

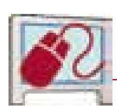
$$\text{Glutamato} + \text{amoniaco} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{glutamina} + \text{ADP} + P_i$$

¿Cuál es la $\Delta G^{\circ\prime}$ de esta reacción? Supóngase que todos los reactivos y productos, excepto el amoniaco, están presentes en concentración 10 mM. ¿Qué concentración de amoniaco se necesitaría para impulsar la reacción a la derecha, esto es, para impulsar la síntesis neta de glutamina?

20. Un inhibidor no competitivo no impide que la enzima se una a su sustrato. ¿Cuál es el efecto del aumento de la concentración de sustrato en presencia de un inhibidor no competitivo?, ¿esperaría que un inhibidor no competitivo afectara la $V_{máx}$ de la enzima?, ¿y de la K_M? Explique de forma breve.

21. En 1926, James Sumner concluyó que la ureasa era una proteína basado en el hecho de que los cristales de la enzima daban resultado positivo para los reactivos que reaccionaban con proteínas y negativo para aquellos que reaccionaban con grasas, carbohidratos y otras sustancias. Su conclusión fue objetada por otros expertos en enzimas que encontraron que sus soluciones enzimáticas con gran actividad no contenían evidencia de proteínas. ¿Cómo pueden conciliarse estos hallazgos en apariencia opuestos?

SITIO EN INTERNET www.wiley.com/college/karp

Las animaciones  y los videos indicados en este capítulo pueden visitarse en el sitio de Cell and Molecular Biology, de Karp en Internet. También hallará todas las respuestas a las preguntas analíticas recién planteadas, autoexámenes que le ayudarán a prepararse para los exámenes, y vínculos con fascinantes recursos. La sección lecturas adicionales que sigue se amplía en el sitio en Internet.

LECTURAS ADICIONALES

Energía

Hammes, G. G. 2000. *Thermodynamics and Kinetics for the Biological Sciences.* Wiley.

Harold, F. M. 1986. *The Vital Force: A Study of Bioenergetics.* Freeman.

Harris, D. A. 1995. *Bioenergetics at a Glance.* Blackwell.

Enzimas y metabolismo (véanse también los libros de bioquímica listados en el capítulo 2)

Benkovic, S. J. & Hammes-Schiffer, S. 2003. A perspective on enzyme catalysis. *Science* 301:1196–1202.

Garcia-Viloca, M., et al. 2004. How enzymes work: Analysis by modern rate theory and computer simulations. *Science* 303:186–195.

Gutteridge, A. & Thornton, J. M. 2005. Understanding nature's catalytic toolkit. *Trends Biochem. Sci.* 30:622–629.

Huang, Y. J. & Montelione, G. T. 2005. Proteins flex to function. *Nature* 438:36–37.

Jencks, W. P. 1997. From chemistry to biochemistry to catalysis to movement. *Annu. Rev. Biochem.* 66:1–18.

Kahn, B. B., et al. 2005. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 1:15–25.

Kornberg, A. 1989. *For the Love of Enzymes.* Harvard.

Koshland, D. E., Jr. 2004. Crazy, but correct. *Nature* 432:447. [sobre la postulación de la hipótesis del ajuste inducido]

Kraut, D. A., et al. 2003. Challenges in enzyme mechanism and energetics. *Annu. Rev. Biochem.* 72:517–571.

Kraut, J. 1988. How do enzymes work? *Science* 242:533–540.

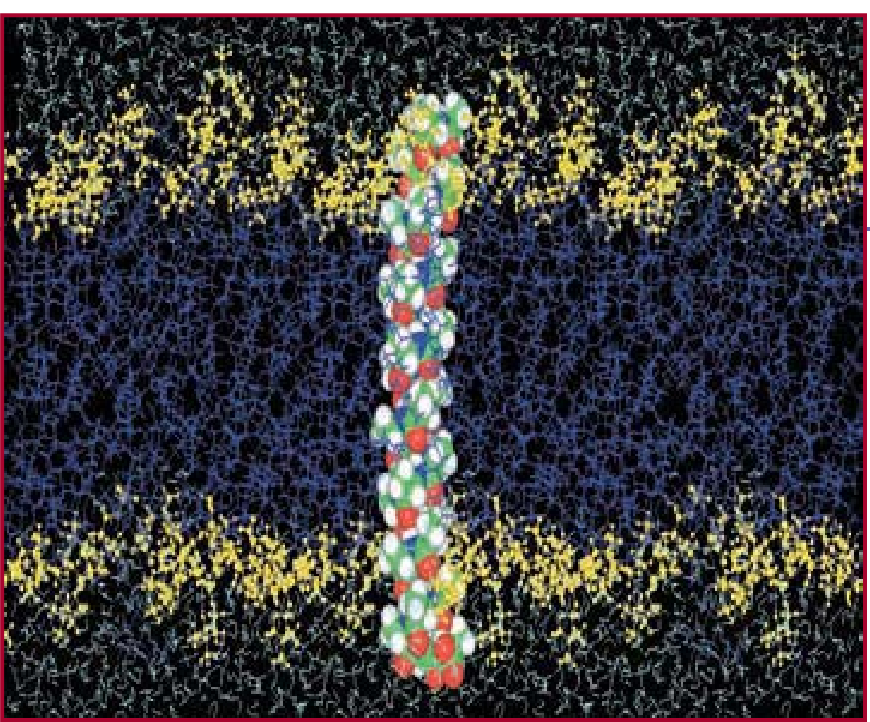
Nathan, C. 2004. Antibiotics at the crossroads. *Nature* 431:899–902.

Palmer, T. 1995. *Understanding Enzymes.* Prentice-Hall.

Vrielink, A. & Sampson, N. 2003. Sub-Ångstrom resolution enzyme X-ray structures: is seeing believing? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13:709–715.

Walsh, C., et al. 2001. Reviews on biocatalysis. *Nature* 409:226–268.

CAPÍTULO



La estructura y función de la membrana plasmática

Las paredes externas de una casa o un automóvil proporcionan una barrera sólida e inflexible que protege a las personas de un mundo exterior impredecible y violento. Podría esperarse que el límite externo de una célula viva se construyera con una barrera igual de resistente e impenetrable porque también debe proteger su delicado contenido interno de un ambiente inerte y a menudo inhóspito. Aun así, las células están separadas del mundo exterior por una estructura delgada y frágil llamada **membrana plasmática**, que sólo mide 5 a 10 nm de espesor. Se necesitarían cerca de cinco mil membranas plasmáticas una sobre otra para igualar el grosor de una sola página de este libro.

Como es tan delgada, no se encuentra ningún indicio de la membrana plasmática cuando se examina una preparación celular con el microscopio óptico. De hecho, fue hasta finales del decenio de 1950, cuando las técnicas para preparar y teñir el tejido progresaron, y la membrana plasmática pudo analizarse con el microscopio electrónico. Estas micrografías electrónicas iniciales, como las tomadas por J. D. Robertson de la *Duke University* (fig. 4-1*a*), presentaron a la membrana plasmática como una estructura de tres capas, consistente en dos capas externas teñidas de color oscuro y una capa intermedia clara. Todas las membranas que se examinaron de cerca, ya fueran plasmáticas, nucleares o citoplásmicas (fig. 4-1*b*), tomadas de plantas, animales o microorganismos, mostraron la misma ultraestructura. Además de suministrar una imagen visual de esta estructura celular vital, estas micrografías electrónicas iniciaron un fuerte debate sobre la

Un modelo de una bicapa lipídica bien hidratada compuesta por moléculas de fosfatidilcolina (cada una con dos ácidos grasos miristoílo) penetradas por una hélice simple que cruza la membrana formada por 32 residuos de alanina. (Tomada de Liyang Shen, Donna Bassolino y Terry Stouch, Bristol-Myers Squibb Research Institute, de Biophysical Journal, vol. 73, p. 6, 1997.)

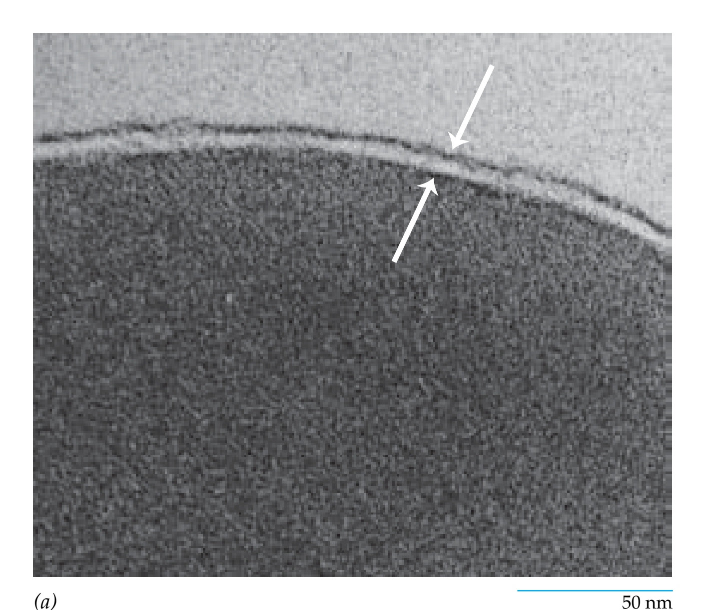


FIGURA 4-1 Apariencia trilaminar de las membranas. *a*) Micrografía electrónica que muestra la estructura de tres capas (trilaminar) de la membrana plasmática de un eritrocito después de teñir el tejido con el metal pesado osmio. El osmio se une de manera preferente con los grupos de cabezas polares de las dos capas de lípidos, lo que produce el patrón trilaminar. Las flechas señalan los bordes interno y externo de la membrana. *b*) El margen externo de una célula muscular diferenciada cultivada muestra la estructura trilaminar similar de la membrana plasmática (PM) y la membrana del retículo sarcoplásmico (SR), un compartimiento del citoplasma para almacenar calcio. (*A*, Cortesía de J. D. Robertson; *B*, tomada de Andrew R. Marks, et al., J Cell Biol 114:305, 1991, con autorización de los derechos reservados de Rockefeller University Press.)

composición molecular de las diversas capas de una membrana, un argumento que llegó al corazón mismo del tema de la estructura y función de la membrana. Como se verá después, las membranas celulares contienen una capa doble de lípidos, y las dos capas con tinción oscura en las micrografías electrónicas de la figura 4-1 corresponden a las superficies polares interna y externa de la bicapa (equivalente a los átomos amarillos de la imagen que abre el capítulo). Más adelante se regresará a la estructura de las membranas, pero primero se revisan algunas de las principales funciones de las membranas en la vida de una célula (fig. 4-2). ●

4.1 UNA REVISIÓN DE LAS FUNCIONES DE LA MEMBRANA

1. ***División en compartimientos.*** Las membranas son hojas continuas y, por eso mismo, es inevitable que cierren compartimientos. La membrana plasmática encierra el contenido de toda la célula, mientras que las membranas nuclear y citoplásmica alojan diversos espacios intracelulares. Estos últimos, limitados por membrana, tienen contenidos muy diferentes. La división en compartimientos por la membrana permite que haya actividades especializadas sin la interferencia externa y posibilita la regulación de las actividades celulares, una independiente de las otras.

2. ***Sitios para las actividades bioquímicas.*** Las membranas no sólo encierran compartimientos, sino que también son un compartimiento distinto por sí mismas. Siempre que haya reactivos en solución, sus posiciones relativas no pueden estabilizarse y sus interacciones dependen de las colisiones aleatorias. A causa de su construcción, las membranas proporcionan a la célula un marco extenso o andamiaje dentro del cual pueden ordenarse componentes para que la interacción sea efectiva.

3. ***Provisión de una barrera con permeabilidad selectiva.*** Las membranas evitan el intercambio irrestricto de moléculas de un lado al otro. Al mismo tiempo, las membranas suministran los medios de comunicación entre los compartimientos que separan. La membrana plasmática, que rodea a la célula, puede compararse con el foso que circunda a un castillo; ambos sirven como una barrera general, aunque los dos tienen "puentes" que promueven el movimiento de elementos seleccionados hacia el interior y exterior del espacio vivo cercado.

4. ***Transporte de solutos.*** La membrana plasmática contiene la maquinaria para el transporte físico de sustancias de un lado de la membrana al otro, a menudo de una región con baja concentración del soluto a otra en la que el soluto alcanza una

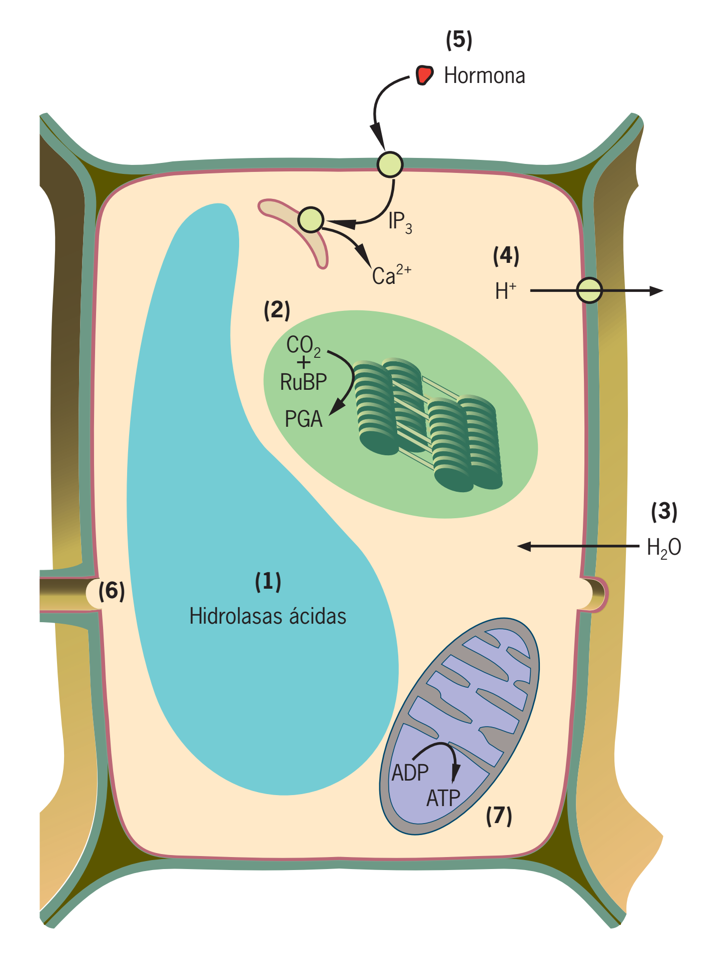


FIGURA 4-2 Resumen de las funciones de la membrana en una célula vegetal. 1) Ejemplo de la división en compartimientos de la membrana en la que las enzimas hidrolíticas (hidrolasas ácidas) quedan secuestradas dentro de una vacuola limitada por membrana. 2) Ejemplo del papel de las membranas citoplásmicas como sitio de localización enzimática. La fijación de CO_2 por la célula vegetal es una reacción catalizada por una enzima que se relaciona con la superficie externa de las membranas tilacoides de los cloroplastos. 3) Ejemplo del papel de las membranas como barrera semipermeable. Las moléculas de agua pueden penetrar con rapidez la membrana plasmática, lo que hace que la célula vegetal llene el espacio disponible y ejerza presión contra su pared celular. 4) Ejemplo de transporte de solutos. Los iones hidrógeno, que se producen en varios procesos metabólicos en el citoplasma, se bombean al exterior de las células vegetales hacia el espacio extracelular por una proteína transportadora localizada en la membrana plasmática. 5) Ejemplo del compromiso de una membrana en la transferencia de información de un lado al otro (transducción de señal). En este caso, una hormona (p. ej., ácido abscísico) se une con la superficie externa de la membrana plasmática y desencadena la liberación de un mensaje químico (como IP_3) hacia el citoplasma. En este caso, el IP_3 induce la liberación de iones Ca^{2+} de una reserva citoplásmica. 6) Ejemplo del papel de las membranas en la comunicación entre células. Las aberturas entre las células vegetales adyacentes, llamadas plasmodesmas, permiten el movimiento de materiales directamente del citoplasma de una célula al de sus vecinas. 7) Ejemplo del papel de las membranas en la transducción de energía. La conversión de ADP en ATP ocurre en estrecha relación con la membrana interna de la mitocondria.

concentración mucho mayor. La maquinaria de transporte de la membrana permite a la célula acumular sustancias, como azúcares y aminoácidos, necesarios para impulsar el metabolismo y construir macromoléculas. La membrana plasmática también es capaz de transportar iones específicos, con lo que establece gradientes iónicos a través de ella misma. Esta capacidad es crucial para las células nerviosas y musculares.

5. ***Respuesta a señales externas.*** La membrana plasmática posee un papel crítico en la respuesta de una célula a los estímulos externos, un proceso que se conoce como **transducción de señales**. Las membranas tienen **receptores** que se combinan con moléculas específicas (o **ligandos**) que incluyen una estructura complementaria. Diferentes tipos de células muestran membranas con distintos receptores, por lo que son capaces de reconocer y responder a distintos ligandos en su ambiente. La interacción de un receptor de la membrana plasmática con un ligando externo puede hacer que la membrana genere una señal que estimula o inhibe las actividades internas. Por ejemplo, las señales generadas en la membrana plasmática pueden informar a la célula que elabore más glucógeno, se prepare para la división celular, se mueva hacia donde existe una mayor concentración de un compuesto en particular, libere calcio de sus reservas internas, o tal vez que cometa suicidio.

6. ***Interacción celular.*** Situada al borde externo de todas las células vivas, la membrana plasmática de los organismos multicelulares media las interacciones entre una célula y sus vecinas. La membrana plasmática permite que las células se reconozcan y envíen señales entre sí, que se adhieran cuando sea apropiado y que intercambien materiales e información.

7. ***Transducción de energía.*** Las membranas forman parte íntima de los procesos mediante los cuales un tipo de energía se transforma en otro tipo (transducción de energía). La transducción de energía más importante ocurre durante la fotosíntesis cuando los pigmentos unidos a la membrana absorben la energía de la luz solar, la convierten en energía química y la almacenan en carbohidratos. Las membranas también participan en la transferencia de energía química de carbohidratos y grasas hacia ATP. En las células eucariotas, la maquinaria para estas conversiones energéticas está contenida dentro de las membranas de los cloroplastos y las mitocondrias.

Este capítulo se concentra en la estructura y funciones de la membrana plasmática, pero hay que recordar que los principios descritos aquí son comunes a todas las membranas celulares. Los aspectos especializados de la estructura y funciones de las membranas de las mitocondrias, los cloroplastos, la citoplásmica y la nuclear se describen en los capítulos 5, 6, 8 y 12, respectivamente.

4.2 UNA BREVE HISTORIA DE LOS ESTUDIOS SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Durante el decenio de 1890, Ernst Overton de la Universidad de Zürich presentó las primeras nociones sobre la naturaleza química de la capa limítrofe externa de una célula. Overton sabía que los solutos no polares se disolvían con más facilidad en solventes no polares que en los polares, y que los solutos polares tenían la solubilidad contraria. Él razonó que para que una sustancia entrara a una célula a partir del medio, primero debía disolverse en la capa limitante externa de esa célula. Para probar la permeabilidad de la capa limitante externa, Overton colocó pelos de raíz vegetal en cientos de soluciones diferentes que contenían distintas combinaciones de solutos. Descubrió que mientras más soluble fuera el soluto, entraba con más rapidez a las células de los pelos radiculares (véase pág. 148). Concluyó que el poder de disolución de la capa limitante externa de la célula concordaba con la de un aceite graso.

La primera proposición de que las membranas celulares podrían contener una bicapa de lípidos la hicieron en 1925 dos científicos holandeses, E. Gorter y F. Grendel. Estos investigadores extrajeron el lípido de los eritrocitos humanos y midieron la cantidad de superficie que el lípido cubriría cuando se extendía sobre la superficie del agua (fig. 4-3*a*). Como los eritrocitos maduros de los mamíferos carecen de núcleo y organelos citoplásmicos, la membrana plasmática es la única estructura que contiene lípidos y puede asumirse que todos los lípidos extraídos de las células estuvieron en las membranas plasmáticas de las células. La proporción entre la superficie de agua cubierta por el lípido extraído y la superficie calculada de los eritrocitos de los que se extrajo el lípido varió de 1.8 a 1 y de 2.2 a 1. Gorter y Grendel conjeturaron que la proporción real era 2:1 y concluyeron que la membrana plasmática contenía una capa bimolecular de lípido, es decir, una **bicapa lipídica** (fig. 4-3*b*). También sugirieron que los grupos polares de cada capa molecular (u hoja) se dirigían hacia fuera, hacia el ambiente acuoso, como se muestra en la figura 4-3*b*, *c*. Ésta sería la disposición favorecida por la termodinámica y un ejemplo excelente de interacción hidrófoba (pág. 35); los grupos de las cabezas polares de los lípidos podrían interactuar con las moléculas de agua circundantes, al mismo tiempo que las cadenas grasoacilo hidrófobas quedarían protegidas del contacto con el ambiente acuoso (fig. 4-3*c*). Por lo tanto, los grupos de la cabeza polar estarían frente al citoplasma por un lado y frente al plasma sanguíneo por el otro. Aunque Gorter y Grendel cometieron varios errores experimentales (que por fortuna se cancelaron entre sí), llegaron a la conclusión correcta de que las membranas contienen una bicapa de lípidos.

Barrera estacionaria

Barrera móvil

Lípidos

(a)

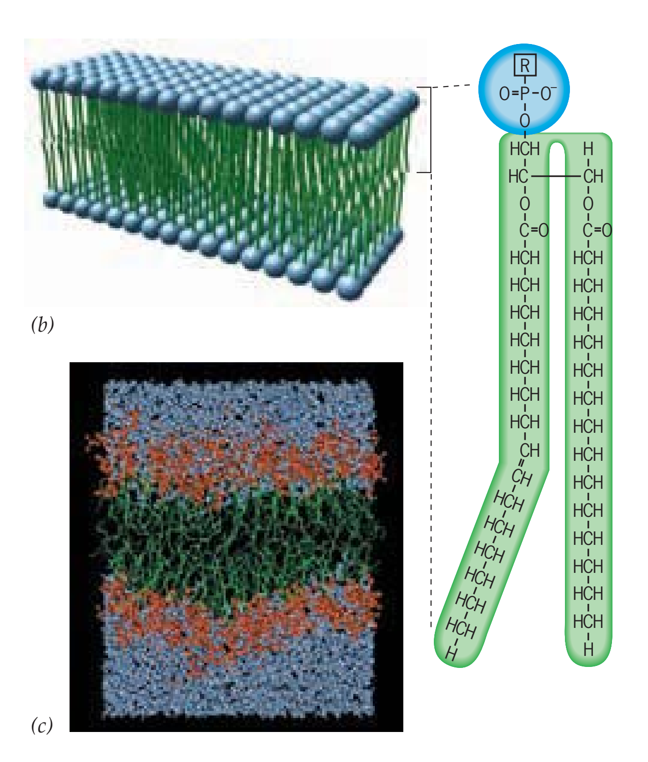


FIGURA 4-3 La membrana plasmática contiene una bicapa lipídica. *a*) Cálculo de la superficie de una preparación de lípidos. Cuando se disuelve una muestra de fosfolípidos en un solvente orgánico, como el hexano, y se extiende sobre una superficie acuosa, las moléculas de fosfolípido forman una capa sobre el agua que tiene una sola molécula de espesor: la capa monomolecular. Las moléculas de la capa están orientadas con sus grupos hidrofílicos unidos a la superficie del agua y las cadenas hidrófobas dirigidas al aire. Para estimar la superficie que cubrirían los lípidos si fueran parte de una membrana, las moléculas de lípido pueden comprimirse en el área más pequeña posible mediante barreras móviles. Con este tipo de aparato, llamado Langmuir en honor de su inventor, Gorter y Grendel concluyeron que los eritrocitos contenían lípido suficiente para formar una capa sobre su superficie que tuviera dos moléculas de espesor: una bicapa. *b*) Como propusieron por primera vez Gorter y Grendel, el centro de la membrana contiene una capa bimolecular de fosfolípidos orientados con sus grupos cabeza hidrosolubles dirigidos hacia las superficies externas y sus colas de ácido graso hidrófobas hacia el interior. Las estructuras de los grupos cabeza se muestran en la figura 4-6*a*. *c*) Simulación de una bicapa de lípidos completamente hidratada compuesta del fosfolípido fosfatidilcolina. Los grupos cabeza fosfolípidos están en color naranja, las moléculas de agua en azul y blanco y las cadenas de ácidos grasos en verde. (*C*, TOMADA DE S.-W. CHIU, TRENDS IN BIOCHEM SCI 22:341, 1997, © 1997, CON AUTORIZACIÓN DE ELSEVIER SCIENCE.)

En las décadas de 1920 y 1930, los fisiólogos celulares obtuvieron evidencia de que debía haber más en la estructura de las membranas que una mera capa doble de lípidos. Por ejemplo, se encontró que la solubilidad en lípidos no era el único factor que determinaba si una sustancia puede o no penetrar la membrana plasmática. De igual manera, se calculó que las tensiones superficiales de las membranas eran mucho menores a las de estructuras lipídicas puras. Este descenso de la tensión superficial pudo explicarse por la presencia de proteína en la membrana. En 1935, Hugh Davson y James Danielli propusieron que la membrana plasmática estaba compuesta por una bicapa de lípidos recubierta en ambas superficies, interna y externa, por una capa de proteínas globulares. Revisaron su modelo a principios de la década de 1950 para explicar la permeabilidad selectiva de las membranas que habían estudiado. En la versión revisada (fig. 4-4*a*), Davson y Danielli sugirieron que, además de las capas externa e interna de proteína, la bicapa lipídica también estaba penetrada por poros recubiertos con proteína, que constituían conductos para que los solutos polares e iones entraran y salieran de la célula.

Los experimentos realizados a finales de la década de 1960 condujeron a un nuevo concepto de la estructura de la membrana,

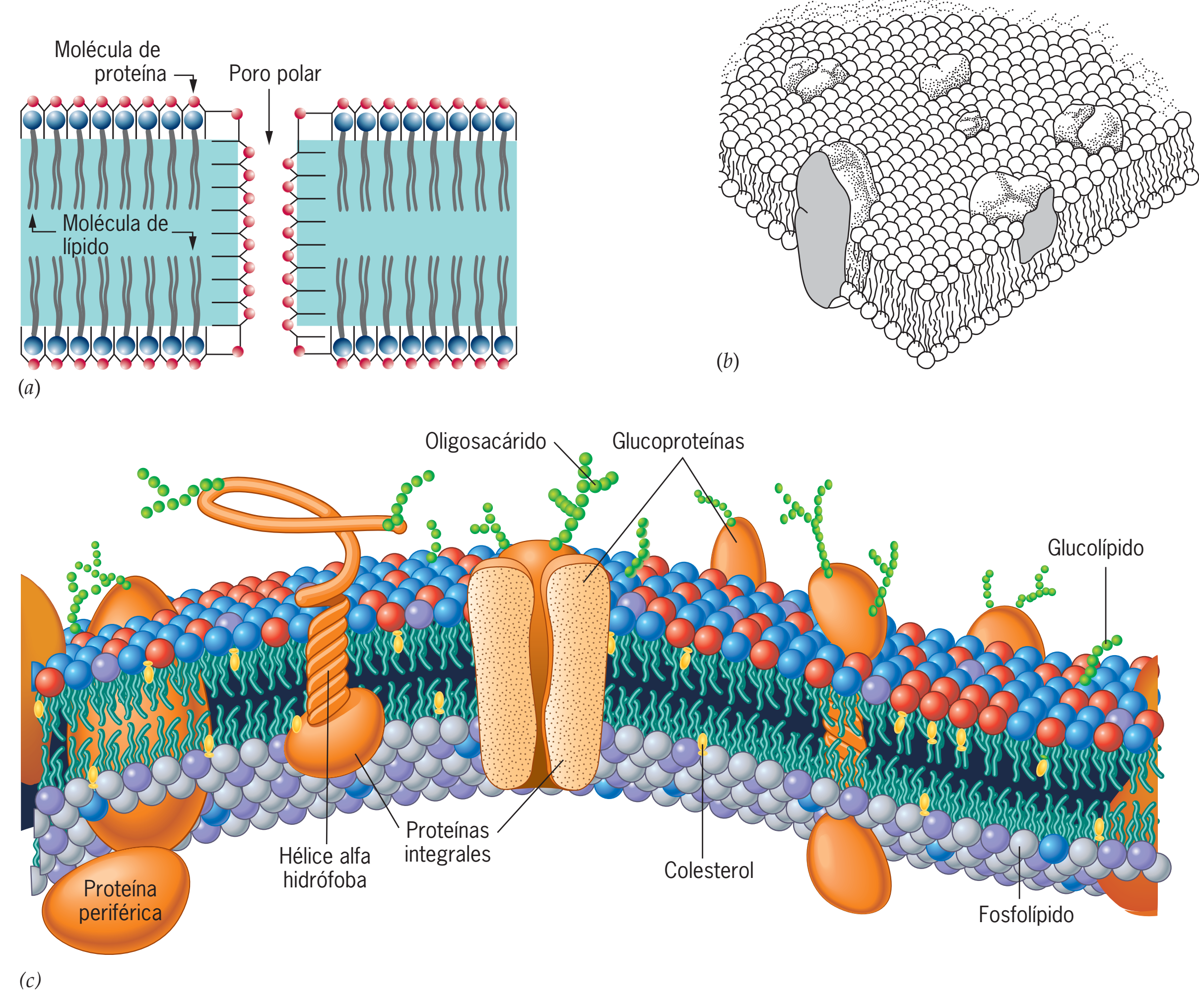


FIGURA 4-4 Breve historia de la estructura de la membrana plasmática. *a*) Una versión revisada en 1954 del modelo de Davson-Danielli que muestra la bicapa lipídica, la cual está recubierta en ambas superficies por una capa monomolecular de proteínas que se extienden a través de la membrana para formar poros recubiertos con proteína. *b*) Modelo de mosaico fluido para la estructura de la membrana como lo propusieron al principio Singer y Nicolson en 1972. A diferencia de los modelos previos, las proteínas penetran la bicapa lipídica. Aunque el modelo original mostrado aquí presenta una proteína que sólo estaba incrustada de manera parcial en la bicapa, las proteínas que penetran la bicapa que se han estudiado cruzan toda la membrana. *c*) Representación actual de la membrana plasmática que muestra la misma organización básica que propusieron Singer y Nicolson. La superficie externa de la mayoría de las proteínas de membrana, así como un pequeño porcentaje de los fosfolípidos, contiene cadenas cortas de azúcares, lo que los convierte en glucoproteínas y glucolípidos. Las porciones de las cadenas polipeptídicas que se extienden por toda la bicapa de lípidos casi siempre se encuentran como hélices alfa compuestas por aminoácidos hidrófobos. Las dos hojas de la bicapa contienen diferentes tipos de lípidos, como lo indican los grupos cabeza de distintos colores. Se cree que la hoja externa posee microdominios ("balsas") consistentes en cúmulos de tipos específicos de lípidos. (*A*, TOMADA DE J. F. DANIELLI, COLLSTON PAPERS 7:8, 1954; *B*, REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE S. J. SINGER Y G. L. NICOLSON, SCIENCE 175:720, 1972; © 1972, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE.)

como se detalla en el modelo de mosaico fluido que propusieron en 1972 S. Jonathan Singer y Garth Nicolson de la *University of California*, en San Diego (fig. 4-4*b*). En el **modelo de mosaico fluido**, que sirvió como el "dogma central" de la biología de la membrana durante tres décadas, la bicapa de lípidos permanece como el centro de la membrana, pero se enfoca la atención en el estado físico del lípido. A diferencia de los modelos previos, la bicapa de una membrana en mosaico fluido se encuentra en estado líquido y las moléculas lipídicas individuales pueden moverse en sentido lateral dentro del plano de la membrana.

La estructura y disposición de las proteínas de la membrana en el modelo de mosaico fluido difieren respecto de los modelos previos en que ocurren como un "mosaico" de partículas discontinuas que penetran la hoja de lípidos (fig. 4-4*b*). Lo más importante es que el modelo de mosaico fluido presenta a las membranas celulares como estructuras dinámicas en las que los componentes son móviles y capaces de unirse para mantener varios tipos de interacciones transitorias o semipermanentes. En las secciones siguientes se examina parte de la evidencia empleada para formular y apoyar este retrato dinámico de la estructura de la membrana y se revisan algunos de los datos recientes que actualizan el modelo (fig. 4-4*c*).

REVISIÓN ?

1. Describa algunos de los papeles importantes de las membranas en la vida de la célula eucariota. ¿Cuál cree que sería el efecto de una membrana que fuera incapaz de realizar una u otra de estas funciones?
2. Resuma algunos de los principales pasos que condujeron al modelo actual de estructura de la membrana. ¿De qué manera cada nuevo modelo conserva ciertos principios básicos de los modelos previos?

4.3 LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS MEMBRANAS

Las membranas son ensambles de lípidos y proteínas en los que los componentes se mantienen unidos en una hoja delgada mediante enlaces no covalentes. Como ya se mencionó, el centro de la membrana consiste en una hoja de lípidos dispuestos en una capa bimolecular (fig. 4-3*b* y *c*). La bicapa lipídica sirve sobre todo como soporte estructural de la membrana y representa una barrera que previene los movimientos aleatorios de materiales hidrosolubles hacia dentro y fuera de la célula. Por otra parte, las proteínas de la membrana realizan la mayoría de las funciones específicas resumidas en la figura 4-2. Cada tipo de célula diferenciada contiene un complemento único de proteínas de membrana que contribuye a las actividades especializadas de ese tipo celular (véase la figura 4-31*d* para obtener un ejemplo).

La proporción entre lípido y proteína en una membrana es variable y depende del tipo de membrana celular (plasmática, de retículo endotelial o del aparato de Golgi), del tipo de organismo (bacteria, planta o animal) y del tipo de célula (cartílago, músculo o hígado). Por ejemplo, la membrana interna de la mitocondria tiene una proporción muy alta entre proteína y lípido en comparación con la membrana plasmática del eritrocito, que a su vez es alta si se la compara con las membranas de la vaina de mielina que forma la envoltura de múltiples capas alrededor de una célula nerviosa (fig. 4-5). En gran parte, estas diferencias pueden relacionarse con las funciones básicas de estas membranas. La membrana mitocondrial interna contiene los portadores proteicos de la cadena para transporte de electrones y, en relación con otras membranas, contiene menos lípidos. En cambio, la función principal de la vaina de mielina es el aislamiento eléctrico para la célula nerviosa que rodea, una función que se realiza mejor con una capa gruesa de lípido de alta resistencia eléctrica y un contenido mínimo de proteína. Las membranas también contienen carbohidratos, que están unidos a los lípidos y proteínas como se indica en la figura 4-4*c*.

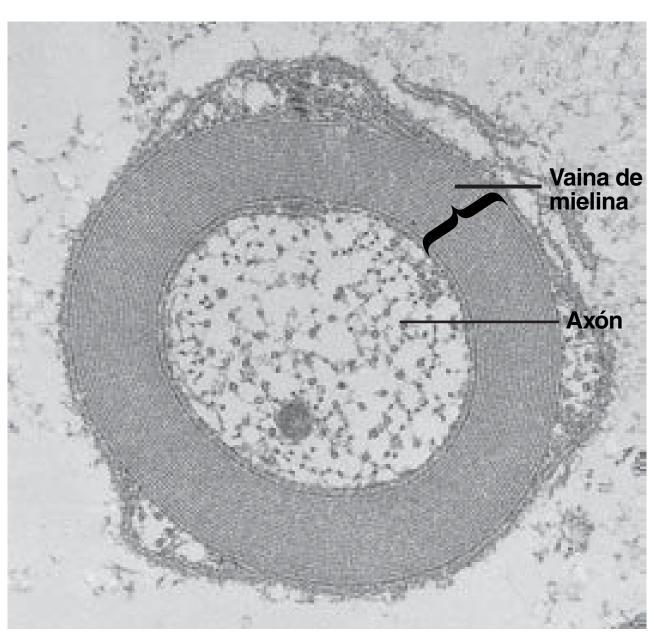


FIGURA 4-5 Vaina de mielina. Micrografía electrónica de un axón neuronal rodeado por una vaina de mielina consistente en capas concéntricas de membrana plasmática que tienen un índice extremadamente bajo de proteína/lípido. La vaina de mielina aísla la célula nerviosa del ambiente externo, lo que aumenta la velocidad con la que discurren los impulsos a lo largo del axón (descrito en la página 167). El espacio perfecto entre las capas se mantiene por el entrelazamiento de las moléculas de proteína (llamadas P_0) que se proyectan de cada membrana. (TOMADA DE LEONARD NAPOLITANO, FRANCIS LEBARON Y JOSEPH SCALETTI, J CELL BIOL 34:820, 1967; CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DE ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

Lípidos de membrana

Las membranas poseen una gran diversidad de lípidos, todos los cuales son **anfipáticos**, esto es, que contienen regiones hidrofílicas e hidrófobas. Hay tres tipos principales de lípidos de la membrana: fosfoglicéridos, esfingolípidos y colesterol.

Fosfoglicéridos La mayoría de los lípidos de la membrana contiene un grupo fosfato que los convierte en **fosfolípidos**. Como la mayor parte de los fosfolípidos de la membrana se forma sobre una estructura de glicerol, se llaman **fosfoglicéridos** (fig. 4-6*a*). A diferencia de los triglicéridos que tienen tres ácidos grasos (pág. 48) y no son anfipáticos, los glicéridos de la membrana son *diglicéridos* y sólo se esterifican dos grupos hidroxilo del glicerol para formar ácidos grasos; el tercero se esterifica con un grupo fosfato hidrofílico. Si no se hacen más sustituciones aparte del fosfato y las dos cadenas grasas acilo, la molécula se conoce como *ácido fosfatídico*, que no existe en la mayoría de las membranas. En lugar de ello, los fosfoglicéridos de la membrana tienen un grupo adicional unido con el fosfato, por lo general colina (forma *fosfatidilcolina*, PC), etanolamina (forma *fosfatidiletanolamina*, PE), serina (forma *fosfatidilserina*, PS) o inositol (forma *fosfatidilinositol*, PI). Todos estos grupos son pequeños e hidrofílicos y junto con el fosfato de carga negativa al que están unidos crean un dominio muy hidrosoluble en un extremo de la molécula, llamado **grupo cabeza**. A pH fisiológico, los grupos cabeza de PS y PI tienen una carga global negativa, mientras que los de PC y PE son neutros. Sin embargo, las cadenas grasas acilo son hidrocarburos no ramificados hidrófobos de unos 16 a 20 carbonos de longitud (fig. 4-6). Un ácido graso de la membrana puede estar saturado del todo (es decir, carece de enlaces dobles), monoinsaturado (tiene un enlace doble) o poliinsaturado (posee más de un enlace doble). Los fosfoglicéridos contienen a menudo una cadena grasa acilo insaturada y una saturada. En fechas recientes el interés se ha centrado en los claros beneficios para la salud de dos ácidos grasos altamente insaturados (EPA y DHA) presentes en altas concentraciones en aceites de pescado. EPA y DHA contienen cinco y seis dobles enlaces, respectivamente, y se incorporan principalmente en moléculas PE y PC de determinadas membranas, de manera más notable en encéfalo y retina. EPA y DHA se describen como ácidos grasos omega-3, porque su último doble enlace se sitúa a tres carbonos del extremo omega (CH_3) de la cadena grasoacilo. Con las cadenas de ácido graso al final de la molécula y un grupo cabeza polar en el otro extremo, los fosfoglicéridos tienen un carácter anfipático distintivo.

Esfingolípidos Una clase menos abundante de lípidos de membrana, los **esfingolípidos**, son derivados de la esfingosina, un alcohol amino que contiene una larga cadena de hidrocarburo (fig. 4-6*b*). Los esfingolípidos se forman con esfingosina enlazada con un ácido graso (R en la figura 4-6*b*) por su grupo amino. Esta molécula es una *ceramida*. Los diversos lípidos con base de esfingosina poseen grupos adicionales esterificados

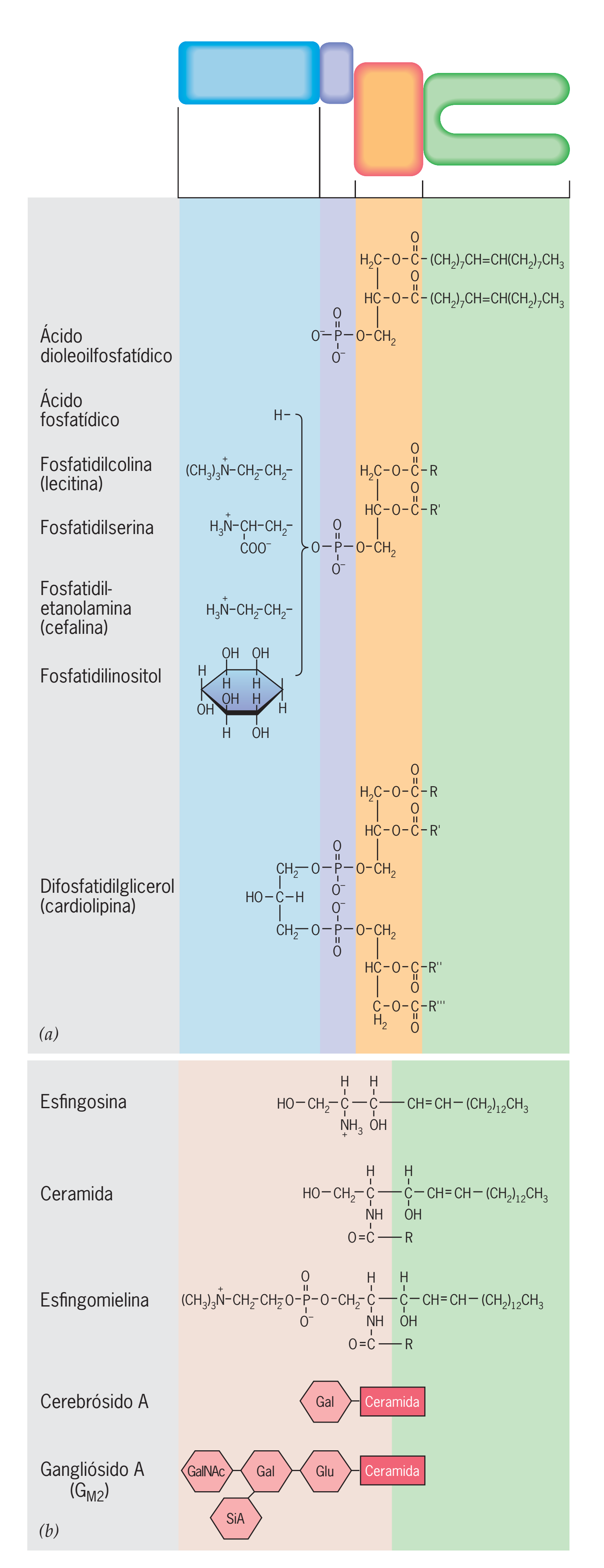


FIGURA 4-6 Estructura química de los lípidos de la membrana. *a*) Estructuras de los fosfoglicéridos (véase también fig. 2-22). *b*) Estructuras de los esfingolípidos. La esfingomielina es un fosfolípido; cerebrósidos y gangliósidos son glucolípidos. Un tercer lípido de la membrana es el colesterol, que se muestra en la figura siguiente. (R, cadena acilo grasa.) (La porción verde de cada lípido, que representa la cola hidrófoba de la molécula, es en realidad mucho más larga que el grupo cabeza hidrofílico [véase fig. 4-21].)

con el alcohol terminal de la fracción esfingosina. Si la sustitución es con fosforilcolina, la molécula es *esfingomielina*, que es el único fosfolípido de la membrana que no se forma con una espina dorsal de glicerol. Si el sustituyente es un carbohidrato, la molécula es un **glucolípido**. Si el carbohidrato es un azúcar simple, el glucolípido se llama *cerebrósido*; si es un oligosacárido, se trata de un *gangliósido*. Ya que todos los esfingolípidos tienen dos largas cadenas hidrófobas de hidrocarburos en un extremo y una región hidrofílica en el otro, también son anfipáticos y similares a la estructura general de los fosfoglicéridos.

Los glucolípidos son componentes interesantes de la membrana. Se sabe relativamente poco sobre ellos, pero han surgido indicios que sugieren que tienen participación crucial en la función celular. El sistema nervioso es muy rico en glucolípidos. La vaina de mielina dibujada en la figura 4-5 tiene un alto contenido de un glucolípido particular llamado galactocerebrósido (mostrado en la figura 4-6*b*) y que se forma cuando se agrega una galactosa a la ceramida. Los ratones que carecen de la enzima que realiza esta reacción tienen temblores musculares intensos y al final llegan a la parálisis. De modo similar, las personas incapaces de sintetizar un gangliósido específico (G_{M3}) sufren una enfermedad neurológica grave caracterizada por convulsiones intensas y ceguera. Los glucolípidos también participan en ciertas enfermedades infecciosas; las toxinas que causan el cólera y el botulismo entran a la célula blanco mediante la unión previa con los gangliósidos de la superficie celular, tal como lo hace el virus de la influenza.

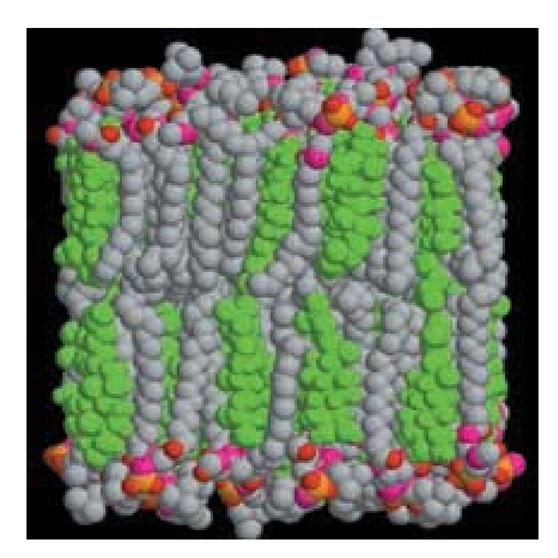


FIGURA 4-7 **Las moléculas de colesterol** (mostradas en verde) de una bicapa de lípidos están orientadas con su extremo hidrofílico hacia la superficie externa de la bicapa y la mayor parte de su estructura empacada entre las colas de los ácidos grasos de los fosfolípidos. La colocación de las moléculas de colesterol interfiere con el empaquetado ajustado de los fosfolípidos, lo cual tiende a aumentar la fluidez de la bicapa. A diferencia de la mayoría de los lípidos de la membrana, el colesterol se distribuye a menudo de manera bastante uniforme entre las dos capas (hojas). (Reimpresa de H. L. Scott, Curr Opin Struct Biol 12:499, 2002, © 2002, con autorización de Elsevier Science.)

Colesterol Otro componente lipídico de ciertas membranas es el esterol **colesterol** (véase fig. 2-21), que en ciertas células animales puede constituir hasta 50% de las moléculas de lípidos en la membrana plasmática. Este compuesto no existe en las membranas plasmáticas de la mayoría de las plantas y todas las células bacterianas. El colesterol es más pequeño que otros lípidos de la membrana y menos anfipático. Las moléculas de colesterol se orientan con su pequeño grupo hidroxilo hidrofílico hacia la superficie de la membrana y el resto de la molécula permanece incrustado en la bicapa lipídica (fig. 4-7). Los anillos hidrófobos de una molécula de colesterol son planos y rígidos e interfieren con los movimientos de las colas de los ácidos grasos de los fosfolípidos (pág. 137).

La naturaleza e importancia de la bicapa lipídica Cada tipo de membrana celular tiene su propia composición lipídica que difiere de las demás por los tipos de lípidos, la naturaleza de los grupos cabeza y las especies particulares de cadenas acilo grasas. Debido a esta variabilidad estructural, se estima que algunas membranas biológicas contienen cientos de especies químicamente distintas de fosfolípidos. El cuadro 4-1 presenta los porcentajes de algunos de los principales tipos de lípidos de diversas membranas. Los lípidos de una membrana son más que simples elementos estructurales; tienen efectos importantes en las propiedades biológicas de una membrana. La composición de los lípidos puede determinar el estado físico de la membrana (pág. 137) e influir en la actividad de las proteínas particulares de la membrana. Los lípidos de la membrana también proporcionan los precursores para los mensajeros químicos muy activos que regulan la función celular (sección 15.3).

Varios tipos de mediciones indican que las cadenas acilo grasas combinadas de ambas hojas de la bicapa lipídica abarcan una anchura aproximada de 30 Å y que cada hilera de grupos cabeza (con su cubierta adyacente de moléculas de agua) agrega 15 Å más (véase la ilustración inicial del capítulo en la página 120). Por lo tanto, toda la bicapa lipídica sólo mide cerca de 60 Å (6 nm) de grosor. La presencia de membranas de esta delgada

Cuadro 4-1 Composiciones de lípidos de algunas membranas biológicas*

Lípido	Eritrocito humano	Mielina humana	Mitocondria de corazón bovino	*E. coli*
Ácido fosfatídico	1.5	0.5	0	0
Fosfatidilcolina	19	10	39	0
Fosfatidil-etanolamina	18	20	27	65
Fosfatidilglicerol	0	0	0	18
Fosfatidilserina	8.5	8.5	0.5	0
Cardiolipina	0	0	22.5	12
Esfingomielina	17.5	8.5	0	0
Glucolípidos	10	26	0	0
Colesterol	25	26	3	0

* Los valores presentados son el porcentaje del peso del total de lípidos.
Fuente: C. Tanford, *The Hydrophobic Effect*, pág. 109, © 1980, John Wiley & Sons, Inc. Reimpreso con autorización de John Wiley & Sons, Inc.

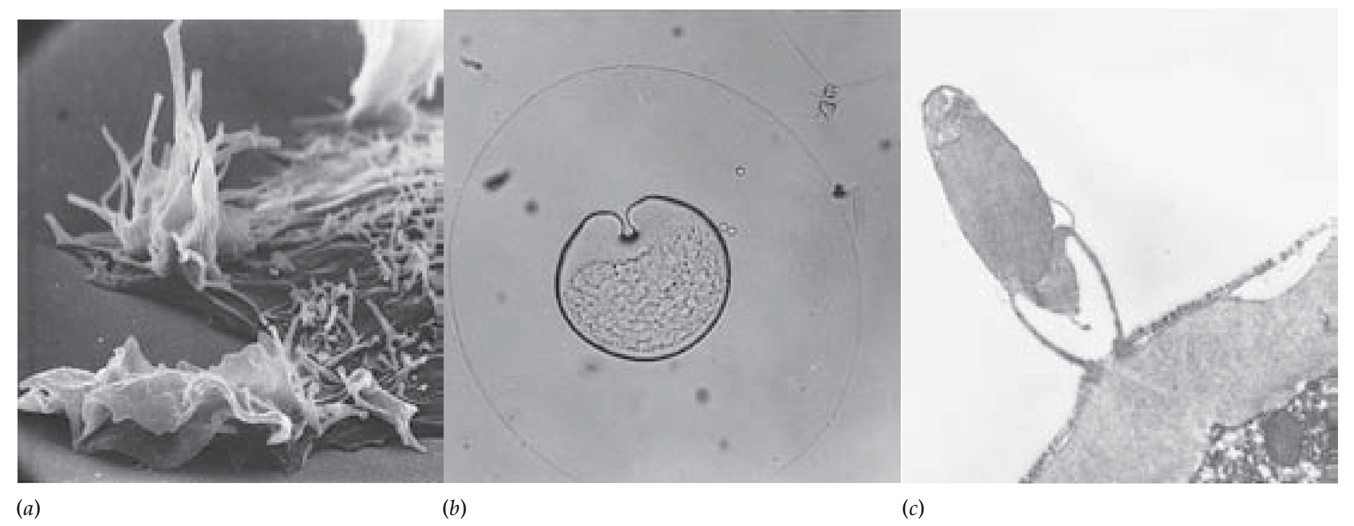

(*a*) (*b*) (*c*)

FIGURA 4-8 Las propiedades dinámicas de la membrana plasmática. *a*) El borde líder de una célula móvil contiene muchas veces sitios en los que la membrana plasmática presenta crestas ondulantes. *b*) La división de una célula se acompaña de la deformación de la membrana plasmática cuando se aproxima al centro de la célula. A diferencia de la mayoría de las células en división, la hendidura de separación de este huevo de ctenóforo comienza en un polo y avanza en una sola dirección por todo el huevo. *c*) Las membranas son capaces de fusionarse con otras membranas. Este espermatozoide y óvulo están en una etapa que conduce a la fusión de sus membranas plasmáticas. (*A*, Cortesía de Jean-Paul Revel; *B*, Cortesía de Gary Freeman; *C*, Cortesía de A. L. Colwin y L. H. Colwin.)

hoja doble de moléculas de lípidos anfipáticos tiene consecuencias notables en la estructura y función celulares. Debido a consideraciones termodinámicas, las cadenas de hidrocarburos de la bicapa de lípidos nunca quedan expuestas a la solución acuosa circundante. Por consiguiente, nunca se ve que las membranas tengan un borde libre; siempre son estructuras continuas e íntegras. Como resultado, las membranas forman extensas redes interconectadas dentro de la célula. Gracias a la flexibilidad de la bicapa de lípidos, las membranas son deformables y su forma puede cambiar, como sucede durante la locomoción (fig. 4-8*a*) o la división celular (fig. 4-8*b*). Se cree que la bicapa de lípidos facilita la fusión regulada o gemación de las membranas. Por ejemplo, los fenómenos de la secreción, en los que las vesículas citoplásmicas se fusionan con la membrana plasmática, o los sucesos de la fecundación, en los que dos células se fusionan para formar una sola (fig. 4-8*c*), implican procesos en los que dos membranas separadas se unen para convertirse en una hoja continua (véase fig. 8-32). En este capítulo y los siguientes queda clara la importancia de la bicapa lipídica para el mantenimiento de la composición interna apropiada de una célula, para separar las cargas eléctricas a través de la membrana plasmática y en muchas otras actividades celulares.

Otra característica relevante de la bicapa de lípidos es su capacidad para ensamblarse a sí misma, lo cual puede demostrarse con mayor facilidad dentro de un tubo de ensayo que en una célula viva. Por ejemplo, si se dispersa una pequeña cantidad de fosfatidilcolina en una solución acuosa, las moléculas de fosfolípido se ensamblan de manera espontánea para formar las paredes de vesículas esféricas llenas con líquido llamadas **liposomas**. Las paredes de estos liposomas consisten en una bicapa lipídica continua que se organiza de la misma forma que la bicapa lipídica de una membrana natural. Los liposomas han sido invaluables en la investigación de las membranas. Las proteínas de la membrana pueden insertarse en los liposomas para estudiar su función en un ambiente mucho más simple que el de una membrana natural. Los liposomas también se prueban como vehículos para conducir fármacos o moléculas de DNA dentro del cuerpo. Los fármacos o DNA pueden unirse con la pared del liposoma o tal vez quedar contenidos en altas concentraciones dentro de su luz (fig. 4-9). En estos estudios se construyen las

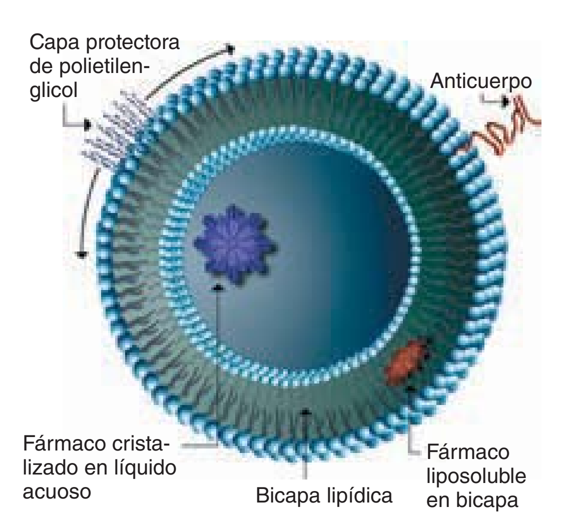


FIGURA 4-9 Liposomas. Esquema de un liposoma furtivo que contiene un polímero hidrofílico (como el polietilenglicol) para protegerlo de la destrucción por las células inmunitarias, moléculas de anticuerpos que lo dirigen contra los tejidos corporales específicos, un fármaco hidrosoluble encerrado en una cámara interior llena con líquido y un fármaco liposoluble en la bicapa.

paredes de los liposomas para que contengan proteínas específicas (como anticuerpos u hormonas) que permiten que los liposomas se unan en forma selectiva con las superficies de células blanco particulares a las que se pretende que llegue el fármaco o el DNA. La mayor parte de los estudios clínicos iniciales con liposomas fracasó porque las vesículas inyectadas se eliminaron poco después por acción de las células fagocíticas del sistema inmunitario. Este obstáculo se salvó con el desarrollo de los llamados "liposomas furtivos" que tienen una cubierta externa de un polímero sintético que protege a los liposomas de la destrucción inmunitaria (fig. 4-9).

Carbohidratos de la membrana

Las membranas plasmáticas de células eucariotas contienen carbohidratos unidos en forma covalente a los componentes lipídicos y proteicos (véase fig. 4-4*c*). Según sean la especie y el tipo de célula, el contenido de carbohidrato de la membrana plasmática varía entre 2 y 10% de su peso. Más de 90% de los carbohidratos de la membrana se une mediante enlaces covalentes a las proteínas para formar glucoproteínas; los carbohidratos restantes se unen en forma covalente a los lípidos para formar glucolípidos, que se describen en la página 127. Como se indica en la figura 4-4*c*, todos los carbohidratos de la membrana plasmática están de frente al espacio extracelular.[1] El carbohidrato de las membranas celulares internas también se dirige al lado contrario del citosol (la base que explica esta orientación se ilustra en la figura 8-14).

La modificación de proteínas se expuso de manera breve en la página 53. La adición de carbohidrato, o **glicosilación** (glucosilación si el carbohidrato en un azúcar) es la más compleja de tales modificaciones. El carbohidrato de las glucoproteínas se encuentra en forma de **oligosacáridos** cortos y ramificados, casi siempre con menos de 15 azúcares por cadena. En contraste con la mayoría de los carbohidratos de alto peso molecular (como glucógeno, almidón o celulosa) que son polímeros de un solo azúcar, los oligosacáridos unidos con las proteínas y lípidos de la membrana tienen composición y estructura muy variables. Los oligosacáridos pueden unirse con varios aminoácidos diferentes mediante dos tipos principales de enlaces (fig. 4-10). Estas proyecciones de carbohidratos tienen un papel en la mediación de las interacciones de una célula con su ambiente (cap. 7) y para destinar a las proteínas de la membrana a los diferentes compartimientos celulares (cap. 8). Los carbohidratos de los glucolípidos de la membrana plasmática de los eritrocitos determinan si el tipo sanguíneo de la persona es A, B, AB u O (fig. 4-11). Una persona con tipo sanguíneo A posee una enzima que agrega una *N*-acetilgalactosamina al extremo de la cadena, mientras que una persona con sangre tipo B tiene una enzima que agrega galactosa al final de la cadena. Estas dos enzimas se codifican en versiones alternativas del mismo gen, aunque reconocen diferentes sustratos. Las personas con sangre tipo AB tienen ambas enzimas, mientras que aquellas personas con sangre tipo O carecen de enzimas capaces de unirse a ningún azúcar terminal.

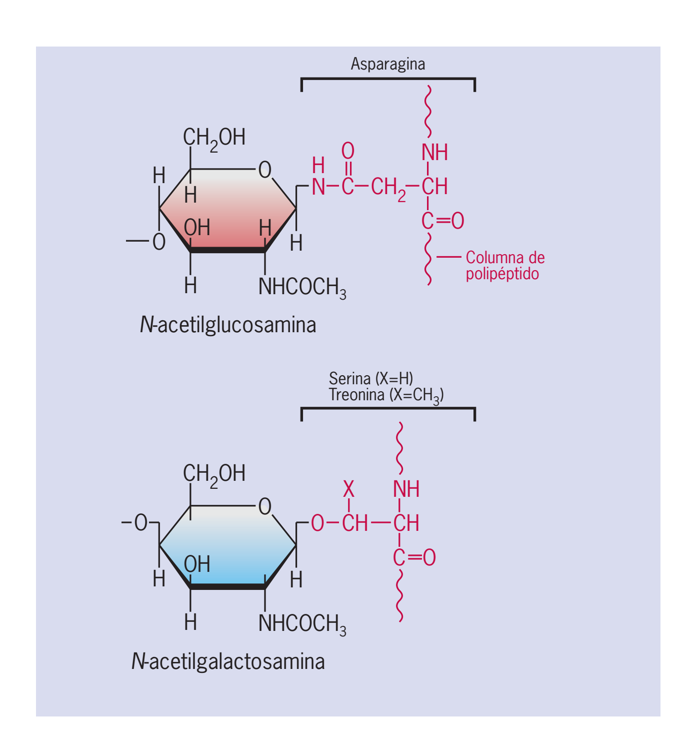


FIGURA 4-10 Dos tipos de enlaces que unen azúcares con una cadena polipeptídica. El enlace *N*-glucosídico entre la asparagina y *N*-acetilglucosamina es más frecuente que el enlace *O*-glucosídico entre la serina o treonina y la *N*-acetilgalactosamina.

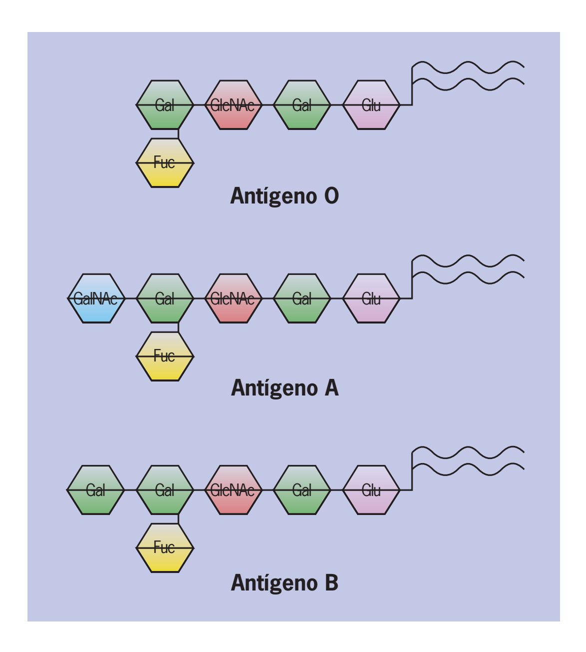


FIGURA 4-11 Antígenos de grupo sanguíneo. Que una persona tenga grupo sanguíneo A, B, AB u O depende de una cadena corta de azúcares unida mediante enlaces covalentes con los lípidos de membrana y proteínas de la membrana celular eritrocitaria. Aquí se muestran los oligosacáridos unidos con los lípidos de membrana (que forman un gangliósido) para producir los tipos sanguíneos A, B y O. Una persona con tipo sanguíneo AB tiene gangliósidos con las estructuras A y B. (Gal, galactosa; GlcNAc, *N*-acetilglucosamina; Glu, glucosa; Fuc, fucosa; GalNAc, *N*-acetilgalactosamina.)

[1] Puede observarse que aunque el fosfatidilinositol contiene un grupo azúcar (fig. 4-6), en esta discusión no se considera parte de la porción carbohidrato de la membrana.

REVISIÓN ?

1. Dibuje la estructura básica de los principales tipos de lípidos que hay en las membranas celulares. ¿En qué difieren los esfingolípidos de los glicerolípidos?, ¿cuáles son los fosfolípidos?, ¿qué son los glucolípidos?, ¿cómo se organizan estos lípidos en una capa doble?, ¿qué importancia tiene la bicapa para las actividades de la membrana?
2. ¿Qué es un liposoma?, ¿cómo se usan los liposomas en los tratamientos médicos?
3. ¿Qué es un oligosacárido?, ¿en qué forma se vincula con las proteínas de la membrana?, ¿cómo se relaciona con los tipos sanguíneos humanos?

4.4 LA ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA

Dependiendo el tipo celular y el organelo en particular dentro de esa célula, una membrana puede contener cientos de proteínas diferentes. Cada proteína de la membrana posee una orientación definida en relación con el citoplasma para que las propiedades de una superficie de la membrana sean muy distintas respecto de las de otra superficie. Esta asimetría se conoce como "lateralidad" de la membrana. Por ejemplo, en la membrana plasmática las partes de las proteínas de membrana que interactúan con otras células o con ligandos extracelulares se proyectan hacia fuera, al espacio extracelular, en tanto que las partes de las proteínas de membrana que interactúan con moléculas del citoplasma se proyectan hacia el citosol. Las proteínas de membrana pueden agruparse en tres clases distintas que se distinguen por su estrecha relación con la bicapa lipídica (fig. 4-12). Éstas son las siguientes:

1. **Proteínas integrales** que penetran la bicapa de lípidos. Las proteínas integrales son **proteínas transmembranosas**, esto es, que cruzan toda la bicapa de lípidos y tienen dominios que sobresalen por ambos lados de la membrana, extracelular y citoplásmico. Algunas proteínas integrales tienen sólo un segmento que abarca la membrana, mientras que otras la cruzan varias veces. Los estudios de secuencia del genoma sugieren que las proteínas integrales de la membrana constituyen de 20 a 30% de todas las proteínas codificadas.
2. **Proteínas periféricas** que se localizan en su totalidad fuera de la bicapa de lípidos, ya sea en el lado citoplásmico o extracelular, aunque se relacionan con la superficie de la membrana mediante enlaces no covalentes.
3. **Proteínas fijadas con lípidos** que se localizan fuera de la bicapa de lípidos, ya sea en la superficie extracelular o la citoplásmica, pero que tienen enlaces covalentes con una molécula de lípidos que se sitúa dentro de la bicapa.

Proteínas integrales de membrana

La mayoría de las proteínas integrales de membrana participan en las siguientes funciones: como receptores que se unen a sustancias específicas en la superficie de la membrana, como cana-

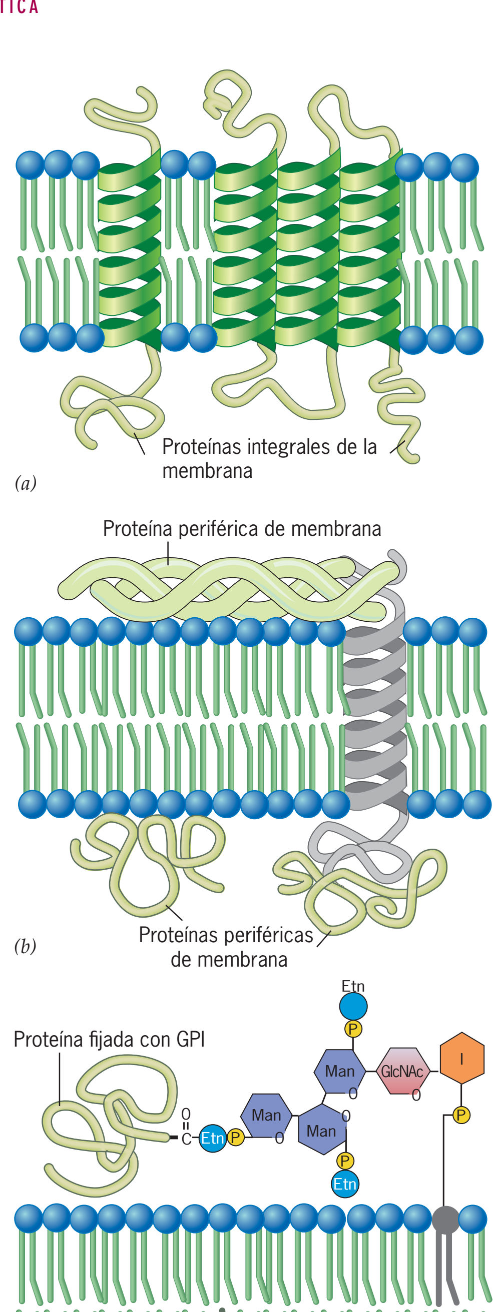
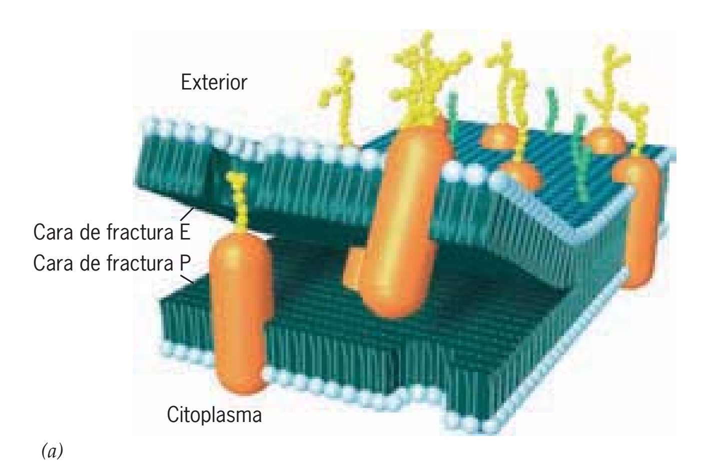


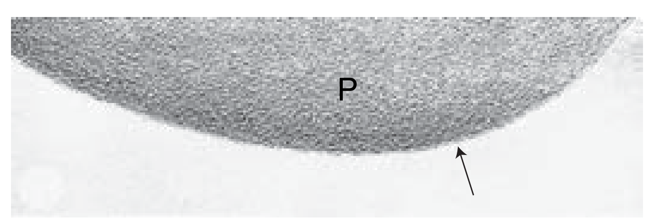
FIGURA 4-12 **Tres clases de proteína de membrana.** *a*) Por lo general, las proteínas integrales contienen una o más hélices transmembranosas (véase la figura 5-4 en relación con una excepción). *b*) Las proteínas periféricas se unen mediante enlaces no covalentes con los grupos cabeza polares de la bicapa de lípidos o una proteína integral de la membrana, o ambos. *c*) Las proteínas fijadas con lípidos se unen a través de enlaces covalentes con un grupo lipídico que reside en la membrana. El lípido puede ser fosfatidilinositol, un ácido graso o un grupo prenilo (un hidrocarburo de cadena larga formado con unidades isoprenoides de cinco carbonos). I, inositol; GlcNAc, *N*-acetilglucosamina; Man, manosa; Etn, etanolamina; GPI, glucosilfosfatidilinositol.

les o transportadores implicados en el movimiento de iones y solutos a través de la membrana, o como agentes que transfieren electrones durante los procesos de fotosíntesis y respiración. Al igual que los fosfolípidos de la bicapa, las proteínas integrales de membrana también son anfipáticas y tienen porciones hidrófobas e hidrofílicas. Como se describe más adelante, las porciones de una proteína integral de membrana que residen dentro de la bicapa lipídica tienden a tener un carácter hidrófobo. Los residuos de aminoácidos de estos dominios transmembranosos forman interacciones de van der Waals con las cadenas acilo grasas de la bicapa, lo cual sella a la proteína dentro de la "pared" de lípidos de la membrana. Como resultado, se conserva la barrera permeable y la proteína queda en contacto directo con las moléculas de lípido circundantes. Las moléculas de lípidos que tienen una relación estrecha con una proteína de membrana pueden tener un papel esencial en la actividad de la proteína. Las porciones de la proteína integral de membrana que se proyectan hacia el citoplasma o el espacio extracelular tienden a ser más parecidas a las proteínas globulares descritas en la sección 2.5. Estos dominios no embebidos en la membrana poseen a menudo superficies hidrofílicas que interactúan con las sustancias hidrosolubles (sustratos de bajo peso molecular, hormonas y otras proteínas) en el borde de la membrana. Varias familias grandes de proteínas de membrana contienen un canal interior que constituye una vía de paso acuosa a través de la bicapa de lípidos. El recubrimiento de estos canales casi siempre contiene residuos hidrofílicos en sitios clave. Como se describe más adelante, no es necesario que las proteínas integrales estén fijas, sino que pueden moverse en sentido lateral dentro de la membrana misma.

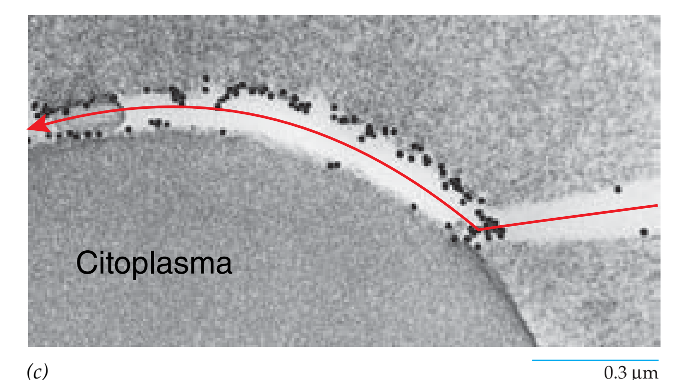
Distribución de proteínas integrales: análisis por congelamiento y fractura El concepto de que las proteínas penetran las membranas en lugar de sólo mantenerse en la superficie de ellas derivó sobre todo de los resultados de una técnica llamada **replicación con fractura-congelamiento** (véase sección 18.2). En este procedimiento, el tejido se congela y luego se golpea con una navaja, lo cual fractura el bloque en dos fragmentos. Cuando esto ocurre, el plano de fractura sigue a menudo un trayecto entre las dos hojas de la bicapa lipídica (fig. 4-13*a*). Una vez que las membranas se separan de esta manera, se depositan metales sobre las superficies expuestas para formar una *réplica* sombreada que se observa al microscopio electrónico (véase fig. 18-17). Como se muestra en la figura 4-13*b*, la réplica parece un camino salpicado de guijarros, llamados *partículas asociadas con la membrana*. Como el plano de fractura pasa por el centro de la capa doble de lípidos, la mayoría de estas partículas corresponde a proteínas integrales de la membrana que se extienden por lo menos hasta la mitad de la distancia al centro lipídico. Cuando el plano de fractura llega a una partícula determinada, la rodea en lugar de partirla por la mitad. Por consiguiente, cada proteína (partícula) se separa con una mitad de la membrana plasmática (fig. 4-13*c*) y deja un hoyuelo correspondiente en la otra mitad (véase fig. 7-30*c*). Uno de los grandes valores de la técnica por congelamiento y fractura es que permite investigar la heterogeneidad microscópica de la membrana. Las diferencias localizadas



(a)



(b)



(c)

FIGURA 4-13 Congelamiento y fractura: una técnica para investigar la estructura de la membrana celular. *a*) Cuando un bloque de tejido congelado se golpea con la hoja de una navaja, un plano de fractura recorre el tejido y muchas veces sigue un trayecto que pasa por la parte intermedia de la bicapa lipídica. El plano de fractura pasa alrededor de las proteínas en lugar de romperlas por la mitad y se separan con alguna de las dos mitades de la bicapa. Las caras expuestas en el centro de la bicapa pueden cubrirse con un depósito metálico para formar una réplica metálica. Estas caras expuestas se conocen como cara E, o ectoplásmica, y cara P, o protoplásmica. *b*) Réplica de un eritrocito humano congelado y fracturado. La cara de fractura P se ve cubierta con partículas de unos 8 nm de diámetro. Una pequeña cresta (flecha) marca la unión de la cara de partículas con el hielo circundante. *c*) Esta micrografía muestra la superficie de un eritrocito que se congeló y luego fracturó, pero en lugar de preparar una réplica, la célula se descongeló, fijó y trató con un marcador para los grupos carbohidrato que se proyectan desde la superficie externa de la proteína integral glucoforina (fig. 4-17). Los cortes delgados de la célula fracturada y marcada revelan que las moléculas de glucoforina (partículas negras) se separaron en forma preferencial con la mitad externa de la membrana. La línea roja muestra el trayecto del plano de fractura. (*B*, TOMADA DE THOMAS W. TILLACK Y VINCENT T. MARCHESI, J CELL BIOL 45:649, 1970; *C*, TOMADA DE PEDRO PINTO DA SILVA Y MARIA R. TORRISI, J CELL BIOL 93:467, 1982. *B*, *C*, CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DE ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

en partes de la membrana sobresalen en estas réplicas y pueden identificarse (como lo ilustra la réplica de una zona de oclusión que se muestra en la figura 7-32*d*). En cambio, los análisis bioquímicos proporcionan un promedio de tales diferencias.

Estudio de la estructura y propiedades de las proteínas integrales de la membrana

A causa de sus dominios hidrófobos transmembranosos, las proteínas integrales de la membrana son difíciles de aislar en su forma soluble. Por lo general, la extracción de estas proteínas de la membrana requiere el uso de un detergente, como el detergente iónico (cargado) SDS (que desnaturaliza las proteínas) o el no iónico (sin carga) Triton X-100 (que casi nunca altera la estructura terciaria de la proteína).

$$CH_3—(CH_2)_{11}—OSO_3^-Na^+$$

Sulfato de dodecilo sódico (SDS)

$$CH_3—C(CH_3)_2—CH_2—C(CH_3)_2—C_6H_4—(O—CH_2—CH_2)_{10}—OH$$

Triton X-100

Al igual que los lípidos de la membrana, los detergentes son anfipáticos y se componen de un extremo polar y una cadena de hidrocarburo no polar (véase fig. 2-20). Como consecuencia de esta estructura, los detergentes pueden sustituir a los fosfolípidos para estabilizar a las proteínas integrales mientras las vuelven solubles en solución acuosa (fig. 4-14). Una vez que las proteínas ya se disolvieron por acción del detergente, pueden realizarse varios procesos analíticos para identificar su composición de aminoácidos, masa molecular, secuencia de aminoácidos, etcétera.

Los investigadores han tenido muchas dificultades para obtener cristales de la mayoría de las proteínas integrales de la membrana para usarlos en la cristalografía con rayos X. De hecho, menos de 1% de las estructuras proteínicas de alta resolución conocidas representan proteínas integrales de membrana (véase una galería actualizada en http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html).[2] Además, la mayoría de estas estructuras representan versiones procariotas de una proteína específica, que a menudo son más pequeñas que sus homólogas eucariotas y más fáciles de obtener en grandes cantidades. Una de las primeras proteínas de membrana cuya estructura tridimensional completa se conoció mediante cristalografía con rayos X se muestra en la figura 4-15. Esta proteína, el centro de reacción fotosintético bacteriano, posee tres subunidades que contienen 11 hélices alfa que cruzan toda la membrana. Algunas de las dificultades técnicas para preparar cristales de proteínas de membrana se han salvado con las nuevas metodologías y con grandes esfuerzos. Por ejemplo, en un estudio reciente los investigadores pudieron obtener cristales de alta calidad de un transportador bacteriano después de probar y depurar más de 95 000 condiciones diferentes para la cristalización. A pesar del éxito creciente obtenido en la cristalización de proteínas, los investigadores aún dependen en buena medida de técnicas indirectas para conocer la organización tridimensional de la mayoría de las proteínas de membrana. En los párrafos siguientes se analizan algunas de estas medidas.

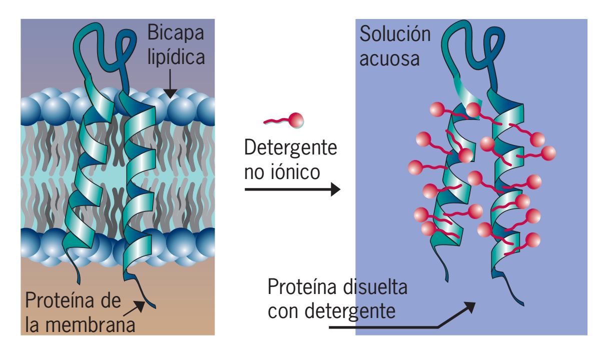


FIGURA 4-14 Disolución de las proteínas de membrana con detergentes. Los extremos no polares de las moléculas de detergente se relacionan con los residuos no polares de la proteína que estaban en contacto con las cadenas de ácido graso de la bicapa lipídica. En cambio, los extremos polares de las moléculas detergentes interactúan con las moléculas de agua circundantes, lo que mantiene la proteína en solución. Como se muestra aquí, los detergentes no iónicos disuelven las proteínas de membrana sin romper su estructura.

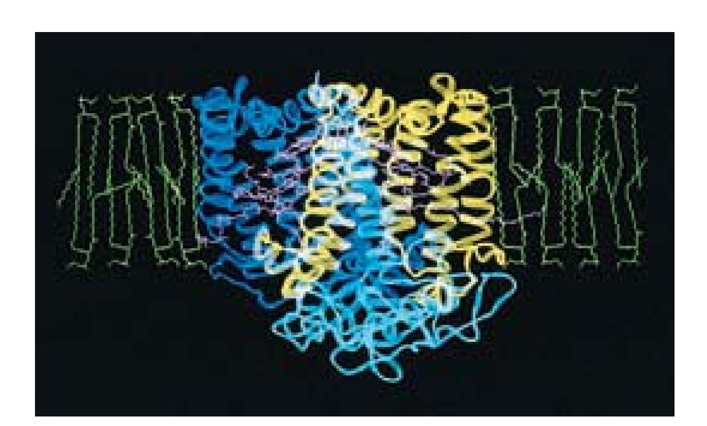


FIGURA 4-15 Proteína integral que reside en la membrana plasmática. Estructura terciaria del centro de la reacción fotosintética de una bacteria reconocida por cristalografía por rayos X. La proteína contiene tres polipéptidos diferentes que cruzan la membrana, mostrados en amarillo, azul claro y azul oscuro. Es evidente la naturaleza helicoidal de cada uno de los segmentos transmembranosos. (Tomada de G. Feher, J. P. Allen, M. Y. Okamura et al.; reimpresa con autorización de Nature 339:113, 1989; © 1989, Macmillan Magazines Limited.)

[2] Muchas proteínas integrales de membrana tienen una porción considerable presente en el citoplasma o el espacio extracelular. En muchos casos, esta porción soluble se separó del dominio transmembranoso, se cristalizó y se identificó su estructura terciaria. Aunque esta técnica aporta datos valiosos sobre la proteína, no suministra información sobre la orientación de la proteína dentro de la membrana. En la sección Vías experimentales de la página 173 se analiza otro método cristalográfico para el estudio de las proteínas de membrana, en el que se usa el microscópio electrónico en vez de la difracción de rayos X.

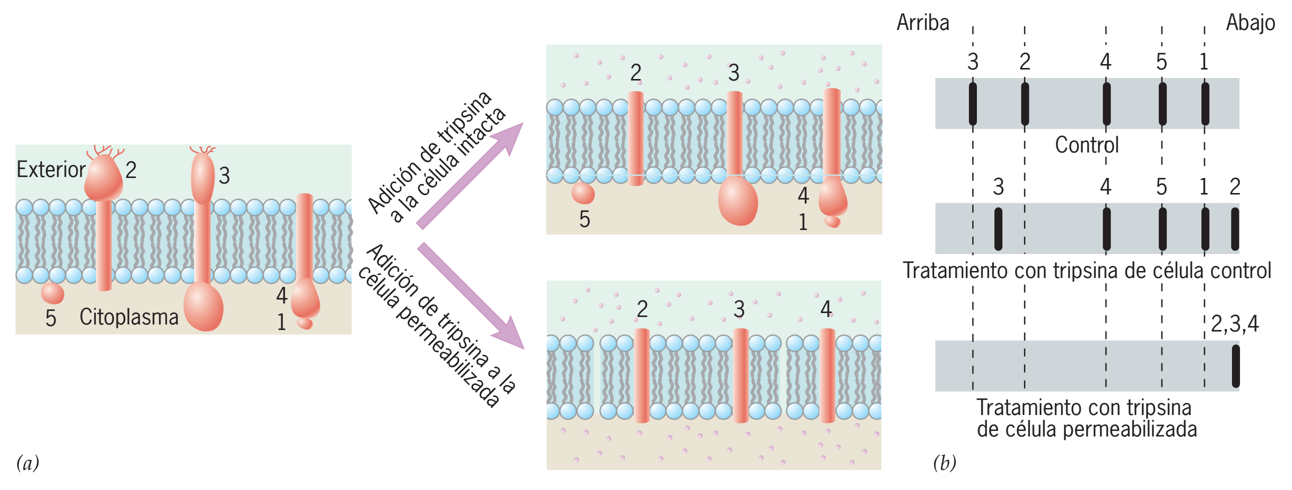


FIGURA 4-16 Procedimiento experimental para identificar la orientación de la proteína dentro de una membrana plasmática. La membrana hipotética que se estudia contiene cinco proteínas distintas. *a*) El tratamiento de las células intactas con la enzima no penetrante tripsina produce digestión de las porciones de las proteínas que se proyectan hacia el medio externo. En cambio, cuando una célula que se volvió permeable (por extracción con detergentes no iónicos o por exposición a un medio hipotónico), las porciones de las proteínas de membrana que se proyectan al citoplasma también son accesibles a la digestión proteolítica. *b*) Esquema de los resultados de la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) que muestra el patrón de bandas obtenido del experimento descrito en *a*. La velocidad con la que una proteína migra durante la electroforesis es inversamente proporcional a su masa molecular. Por lo tanto, la eliminación de partes de la proteína hace que se mueva con más rapidez hacia el fondo del gel. La figura 4-31*c* muestra un ejemplo de un gel SDS-PAGE.

Determinación de la lateralidad de la membrana. ¿Qué partes de una proteína integral de membrana se proyectan en el citoplasma y cuáles sobresalen hacia el exterior de la célula? La respuesta puede obtenerse en forma experimental con agentes no penetrantes que marcan o modifican las proteínas. ¿Qué sucedería si una preparación de células intactas se tratara con una enzima proteolítica, como la tripsina, que es demasiado grande para penetrar la membrana plasmática (fig. 4-16*a,* flecha superior)? Las partes de las proteínas de membrana que se sitúan en la superficie externa de la bicapa de lípidos se someterían a la digestión por la enzima agregada, pero las partes interiores de la bicapa o en la cara citoplásmica de la membrana quedarían intactas. El efecto del tratamiento puede vigilarse si se extraen las proteínas y se las somete a electroforesis en gel con SDS-poliacrilamida (se describe con detalle en la sección 18.7). Las proteínas de las que se digirió una proporción significativa de su estructura migrarían a una posición más baja en el gel que la misma proteína de una membrana no tratada (fig. 4-16*b*). Para establecer si una porción de una proteína sobresale por la cara citoplásmica de la membrana, las células pueden volverse permeables mediante el tratamiento con detergentes no iónicos o por choque osmótico (véase fig. 4-31*b*). En estas condiciones, la membrana plasmática ya no actúa como barrera a la penetración de la enzima proteolítica, por lo que las porciones citoplásmicas de la proteína también se someten a la digestión (porciones inferiores en la figura 4-16*a*, *b*).

Identificación de dominios transmembranosos. ¿Qué segmentos de la cadena polipeptídica están incrustados en la bicapa de lípidos? La identificación de estos **dominios transmembranosos** casi siempre se predice con base en la secuencia de aminoácidos de la proteína, la cual se infiere de la secuencia de nucleótidos de un gen aislado. Los segmentos de una proteína que se presupone cruzan la membrana casi siempre consisten en una cadena de alrededor de 20 aminoácidos de predominio no polar que adoptan una estructura secundaria helicoidal alfa.[3] La figura 4-17 muestra la estructura química de una sola hélice transmembranosa, que tiene la estructura bidimensional de la glucoforina A, la principal proteína integral de la membrana plasmática eritrocitaria. De los 20 aminoácidos que constituyen la única hélice alfa de la glucoforina (aminoácidos 73 a 92 de la figura 4-17), todos excepto tres tienen cadenas laterales hidrófobas (o un átomo H en el caso de los residuos de glicina). Las excepciones son serina y treonina, que son residuos sin carga localizados principalmente en el extremo del segmento embebido cerca de los grupos cabeza lipídicos.

Al conocer la secuencia de aminoácidos de una proteína integral de la membrana, casi siempre pueden identificarse los segmentos transmembranosos si se utiliza la *gráfica hidropática*, en la que a cada sitio del polipéptido se le asigna un valor que proporciona una medida de la *hidrofobicidad* del aminoácido en ese sitio, así como la de sus vecinos. Esta técnica suministra un "promedio continuo" de la hidrofobia de secciones cortas del

[3] En la página 55 se señaló que la hélice alfa es una conformación favorecida porque permite la formación de un número máximo de enlaces hidrógeno entre los residuos de aminoácidos vecinos, lo que crea una configuración muy estable (de baja energía). Esto adquiere importancia particular para un polipéptido que abarca la membrana y está rodeado por cadenas de ácido graso, por lo que no puede formar enlaces de hidrógeno con un solvente acuoso. Las hélices transmembranosas tienen por lo menos 20 aminoácidos de longitud porque ésta es la extensión mínima de un polipéptido capaz de abarcar la bicapa de lípidos de 30 Å de espesor. Se ha encontrado que unas pocas proteínas integrales de membrana contienen hélices que penetran la bicapa pero no la atraviesan. Un ejemplo es la hélice P de la figura 4-38.

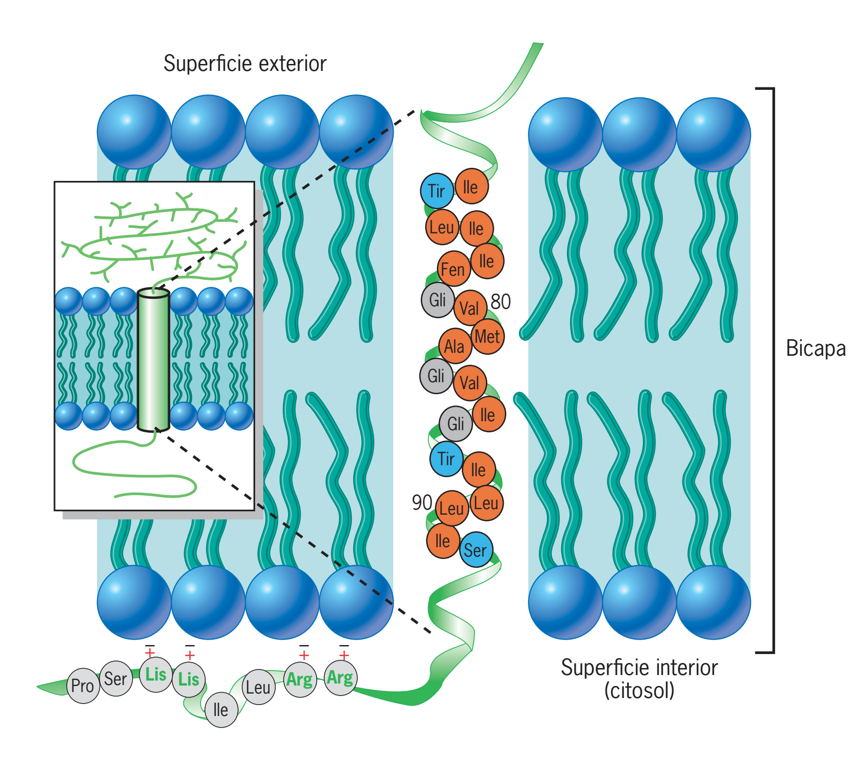


FIGURA 4-17 Glucoforina A, una proteína integral con un solo dominio transmembranoso. La hélice alfa única que pasa por la membrana consiste sobre todo en residuos hidrófobos. Los cuatro residuos de aminoácidos con carga positiva del dominio citoplásmico de la membrana forman enlaces iónicos con los grupos cabeza de los lípidos que tienen cargas negativas. Los carbohidratos se unen con varios residuos de aminoácidos en la superficie externa de la proteína (mostrada en el inserto). Excepto por uno, los 16 oligosacáridos son cadenas pequeñas con enlace *O* (la excepción es un oligosacárido más grande enlazado con el residuo de asparagina en la posición 26). El papel de la glucoforina en la membrana eritrocitaria se describe en la página 146.

polipéptido y garantiza que uno o algunos aminoácidos polares de una secuencia no alteren el perfil de todo el segmento. La hidrofobicidad de los aminoácidos puede determinarse con varios criterios, como su solubilidad en lípidos o la energía necesaria para transferirlos de un medio acuoso a uno lipídico. La figura 4-18 muestra una gráfica de hidropatía para la glucoforina A. Por lo general, los segmentos transmembranosos se identifican como el pico irregular que se extiende dentro del lado hidrófobo del espectro. Las más de las veces puede formularse una suposición racional de la orientación del segmento transmembranoso dentro de la bicapa si se examina la naturaleza de los residuos de aminoácidos que flanquean dicho segmento. En la mayoría de los casos, como se ilustra con la glucoforina en la figura 4-17, esas partes del polipéptido en el flanco citoplásmico de un segmento transmembranoso tienden a mostrar una carga más positiva que los que están en el flanco extracelular.

No todas las proteínas integrales de membrana contienen hélices alfa transmembranosas. Varias proteínas de membrana poseen un canal relativamente grande situado al interior de un círculo de cadenas beta que cruzan la membrana organizadas en forma de barril, como se ilustra en la figura 5-4. Hasta ahora sólo se han encontrado los canales acuosos formados por barriles beta en las membranas externas de bacterias, mitocondrias y cloroplastos.

Determinación de la relación espacial dentro de una proteína integral de membrana. Supóngase que ya se aisló el gen para una proteína integral de la membrana y, con base en su secuencia de nucleótidos, se establece que contiene cuatro hélices alfa aparentes que cruzan la membrana. Tal vez se desearía conocer la orientación de estas hélices entre ellas y qué lado de la cadena de aminoácido de cada cara de la hélice se proyecta hacia el ambiente lipídico. Aunque estas determinaciones son difíciles de realizar sin modelos estructurales detallados, puede obtenerse información relevante por la mutagénesis dirigida a sitios específicos, es decir, mediante la introducción de cambios en el gen que codifica la proteína (sección 18.18). Por ejemplo, puede usarse la mutagénesis dirigida a un sitio específico para sustituir los residuos de aminoácidos en hélices vecinas con residuos de cisteína. Como se explica en la página 53, dos residuos de cisteína son capaces de formar un puente disulfuro covalente. Si dos hélices transmembranosas de un polipéptido tienen un residuo de cisteína cada una y estos dos residuos de cisteína pueden formar un puente disulfuro entre sí, estas hélices deben estar muy

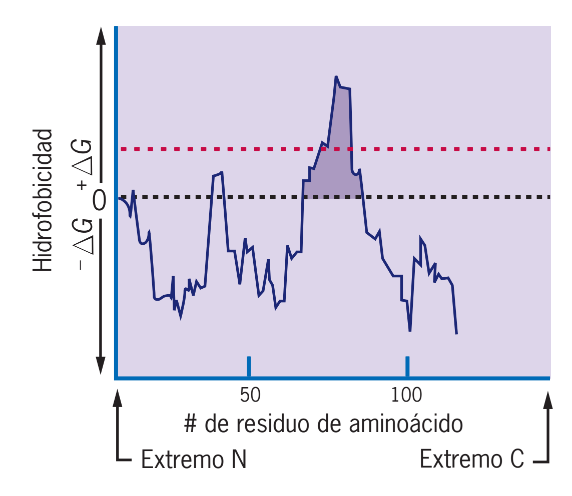


FIGURA 4-18 Gráfica de hidropatía para la glucoforina A, una proteína única que cruza la membrana. La hidrofobia se mide por la energía libre requerida para transferir cada segmento del polipéptido de un solvente no polar a un medio acuoso. Los valores por arriba de la línea cero requieren energía (+Δ*G*), lo que indica que consisten en series de aminoácidos que tienen cadenas laterales de predominio no polar. Los picos que se proyectan por arriba de la línea roja se interpretan como un dominio transmembranoso.

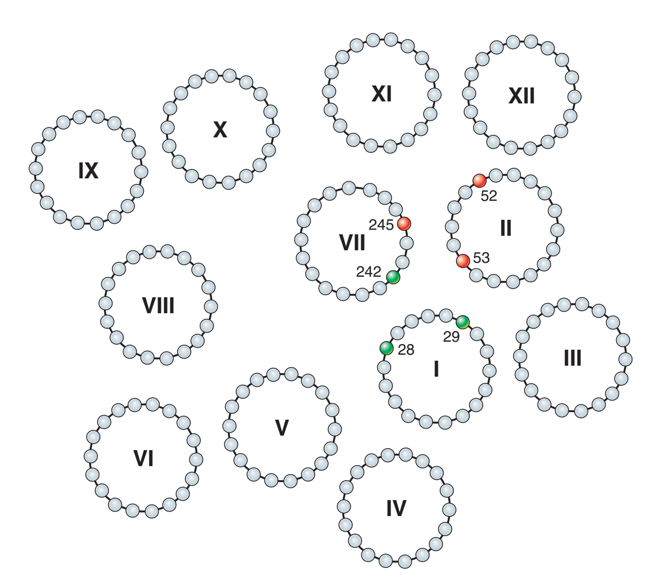
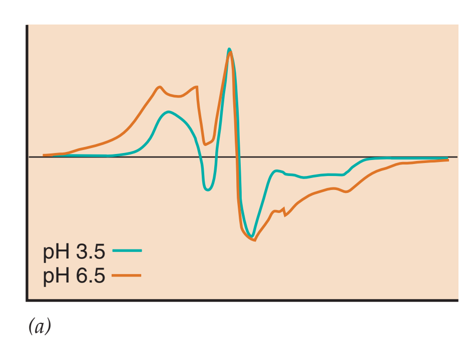


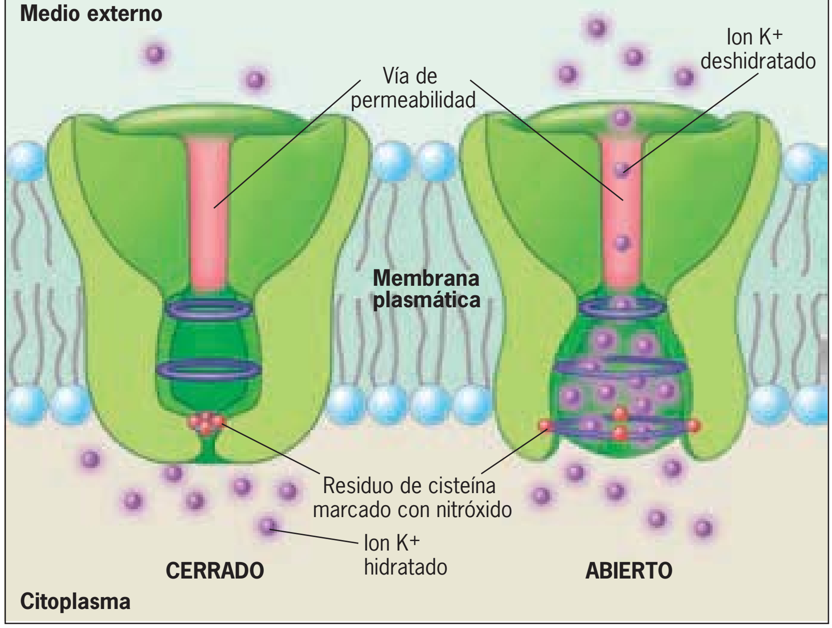
FIGURA 4-19 Determinación del empaque de hélices en una proteína de membrana por enlaces cruzados dirigidos a un sitio. En estos experimentos se introducen pares de residuos de cisteína en la proteína por mutagénesis dirigida a un sitio particular y se identifica la capacidad de las cisteínas para establecer enlaces disulfuro. Las gráficas de hidropatía y otros datos indican que la permeasa de lactosa tiene 12 hélices transmembranosas. Se encontró que una cisteína introducida en la posición 242 de la hélice VII puede establecer enlaces cruzados con la cisteína introducida en la posición 28 o 29 de la hélice I. Una cisteína en la posición 245 de la hélice VII puede establecer enlaces cruzados con las cisteínas en la posición 52 o 53 de la hélice II. Así se establece la proximidad de estas tres hélices. (La estructura por rayos X de esta proteína se publicó en 2003.) (Reimpresa a partir de H. R. Kaback, J. Voss y J. Wu; Curr Opin Struct Biol 7:539, 1997; © 1997, con autorización de Elsevier Science.)

próximas entre sí. En la figura 4-19 se muestran los resultados de un estudio de enlaces cruzados dirigidos a sitios específicos sobre la permeasa de lactosa, una proteína transportadora de azúcar de las membranas celulares bacterianas. En este caso se encontró que la hélice VII está muy cercana a las hélices I y II.

La identificación de las relaciones espaciales entre los aminoácidos en una proteína de membrana puede aportar más que datos estructurales; puede informar a un investigador sobre algunos de los fenómenos dinámicos que ocurren cuando una proteína lleva a cabo su función. Una forma de conocer la distancia entre residuos seleccionados de una proteína consiste en introducir grupos químicos cuyas propiedades sean sensibles a la distancia que los separa. Los *nitróxidos* son grupos químicos que contienen un electrón non, lo cual produce un espectro característico cuando se evalúa con una técnica llamada *espectroscopia por resonancia paramagnética electrónica* (EPR). Puede introducirse un grupo nitróxido en cualquier sitio en una proteína si primero se muta ese sitio para que tenga una cisteína y luego se une el nitróxido al grupo —SH del residuo de cisteína. La figura 4-20 muestra cómo se usó esta técnica para descubrir los cambios en la conformación que ocurren en una proteína de membrana cuando su canal se abre como respuesta a los cambios en el pH del medio. La proteína en cuestión, un canal bacteriano para el potasio, es un tetrámero compuesto por cuatro subunidades idénticas. La abertura citoplásmica al canal está limitada por cuatro hélices transmembranosas, una de cada subunidad de la proteína. La figura 4-20*a* muestra los espectros EPR que se obtuvieron cuando se introdujo un nitróxido cerca del extremo citoplásmico de cada hélice transmembranosa. La línea roja muestra el espectro obtenido a pH 6.5 cuando el canal está cerrado y la línea azul el espectro a pH 3.5 cuando el canal está abierto.



(a)



(b)

FIGURA 4-20 Uso de la espectroscopia por RPE para vigilar los cambios de la conformación de un canal iónico bacteriano para K^+ cuando se abre y cierra. *a*) Espectros por RPE de los nitróxidos que se unieron con residuos de cisteína cerca del extremo citoplásmico de las cuatro hélices transmembranosas que recubren el canal. El residuo de cisteína de cada hélice sustituye a un residuo de glicina que normalmente ocupa esa posición. Las formas de los espectros dependen de las distancias entre los electrones nones en los nitróxidos en las diferentes subunidades. (Los nitróxidos se describen como "etiquetas de giro" y esta técnica se conoce como etiquetado de giro dirigido a un sitio.) *b*) Un modelo muy esquemático del canal iónico en sus estados abierto y cerrado con base en los datos de la parte *a*. La abertura del canal se acompaña del movimiento de los cuatro grupos nitróxido para separarse unos de otros. (*A*, tomada de E. Perozo et al., Nature Struct Biol 5:468, 1998.)

La forma de cada línea depende de la proximidad de los nitróxidos entre sí. El espectro es más ancho en un pH de 6.5 porque los grupos nitróxido de las cuatro subunidades están más próximos entre sí. El espectro es más amplio a pH de 6.5 porque los grupos nitróxido sobre las cuatro subunidades están más cerca entre sí a este pH, lo cual disminuye la intensidad de sus señales de EPR. Estos resultados indican que la activación del canal se acompaña de un aumento de la separación entre los residuos marcados de las cuatro subunidades (fig. 4-20*b*). Un aumento del diámetro de la abertura del canal permite que los iones del citoplasma lleguen a la vía permeable real (mostrada en rojo) dentro del canal, lo que posibilita sólo el paso de los iones K^+ (descrito en la página 153). También puede recurrirse a una técnica alternativa, llamada FRET, para medir los cambios en la distancia entre los grupos marcados dentro de una proteína, como se ilustra en la figura 18-8.

Proteínas periféricas de membrana

Las proteínas periféricas se relacionan con la membrana mediante enlaces electrostáticos débiles (véase la figura 4-12*b*). Por lo general, las proteínas periféricas pueden solubilizarse mediante la extracción con soluciones salinas en altas concentraciones que debilitan los enlaces electrostáticos que mantienen las proteínas periféricas en una membrana. En realidad, la distinción entre las proteínas integrales y periféricas es vaga porque muchas proteínas integrales de membrana están formadas por varios polipéptidos, algunos de los cuales penetran la bicapa lipídica y otros permanecen en la periferia.

Las proteínas periféricas mejor estudiadas se localizan en la superficie interna (citosólica) de la membrana plasmática, donde forman una red fibrilar que actúa como "esqueleto" de la membrana (véase fig. 4-31*d*). Estas proteínas brindan soporte mecánico a la membrana y funcionan como un ancla para las proteínas integrales. Otras proteínas periféricas en la superficie interna de la membrana plasmática funcionan como enzimas, cubiertas especializadas (véase fig. 8-24) o factores que transmiten señales transmembranosas (véase fig. 15-17). Por lo general, las proteínas periféricas tienen una relación dinámica con la membrana, se atraen hacia la membrana o se liberan de ésta, según sean las condiciones prevalecientes.

Proteínas de membrana fijadas a lípidos

Se pueden distinguir varios tipos de proteínas de membrana fijadas a lípidos. Muchas proteínas presentes en la superficie externa de la membrana plasmática están unidas a ésta mediante un pequeño oligosacárido complejo unido con una molécula de fosfatidilinositol que está incrustada en la hoja externa de la bicapa lipídica (véase fig. 4-12*c*). Las proteínas periféricas de membrana que contienen este tipo de enlace glucosilfosfatidilinositol se llaman **proteínas fijadas con GPI**. Éstas fueron descubiertas cuando se demostró que ciertas proteínas de membrana podían liberarse con una fosfolipasa que reconociera y separara en forma específica los fosfolípidos que contenían inositol. La proteína celular normal de la encefalopatía espongiforme ovina PrP^C (pág. 65) es una molécula unida por GPI, al igual que varios receptores, enzimas y proteínas de adhesión celular. Un raro tipo de anemia, la hemoglobinuria paroxística nocturna, se debe a la deficiencia de la síntesis de GPI que vuelve a los eritrocitos susceptibles a la lisis.

Otro grupo de proteínas presente en el lado *citoplásmico* de la membrana plasmática está fijado a la membrana mediante una o más cadenas largas de hidrocarburos embebidas en la hoja interna de la bicapa lipídica (véase fig. 4-12*c*). Por lo menos dos proteínas relacionadas de esta forma con la membrana plasmática (Src y Ras) se han referido en la transformación de una célula normal en una maligna.

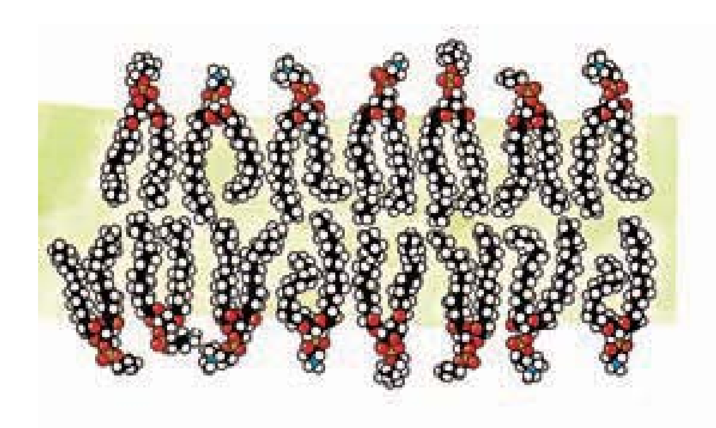
REVISIÓN

1. ¿Por qué son necesarios los detergentes para disolver las proteínas de membrana?, ¿cómo podría identificarse la diversidad de proteínas integrales que residen en una fracción purificada de membrana?
2. ¿Cómo puede determinarse: a) la lateralidad de la membrana; b) la localización de los segmentos transmembranosos en la secuencia de aminoácidos, o c) las localizaciones relativas de las hélices transmembranosas?
3. ¿Qué significa la declaración de que las proteínas de una membrana se distribuyen en forma asimétrica?, ¿también es verdad esto para los carbohidratos de la membrana?
4. Describa las propiedades de las tres clases de proteínas de membrana (integrales, periféricas y fijadas a lípidos), en qué difieren entre sí y cómo varían las de cada grupo individual.

4.5 LÍPIDOS DE MEMBRANA Y FLUIDEZ DE LA MEMBRANA

El estado físico del lípido de una membrana se describe por su fluidez (o viscosidad).[4] Considérese una bicapa artificial simple formada por fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, cuyos ácidos grasos sean en su mayoría insaturados. Si la temperatura de la bicapa se mantiene relativamente tibia (p. ej., 37°C), el lípido se encuentra en un estado líquido (fig. 4-21*a*). En esta temperatura, la bicapa de lípidos puede describirse como un cristal líquido bidimensional. Como en un cristal, las moléculas aún permanecen en una orientación específica; en este caso, los ejes longitudinales de las moléculas tienden a mantener una disposición paralela, aunque los fosfolípidos individuales pueden rotar alrededor de su eje o moverse en sentido lateral dentro del plano de la bicapa. Si la temperatura se reduce con lentitud, se llega a un punto en el que la bicapa muestra cambios distintivos (fig. 4-21*b*). El lípido pasa de una fase cristalina líquida a un gel cristalino congelado en el que se limita en gran proporción el movimiento de las cadenas de ácido graso del fosfolípido. La temperatura en la que ocurre este cambio se llama **temperatura de transición**.

[4] La fluidez y la viscosidad mantienen una relación inversa; la fluidez es la medida de la facilidad para fluir y la viscosidad es la medida de la resistencia al flujo.



(a)

(b)

FIGURA 4-21 La estructura de la bicapa lipídica depende de la temperatura. La bicapa que se muestra se compone de dos fosfolípidos: fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. *a*) Por arriba de la temperatura de transición, las moléculas de lípido y sus colas hidrófobas son libres de moverse en ciertas direcciones, aunque conservan un grado de orden considerable. *b*) Por debajo de la temperatura de transición, se limita mucho el movimiento de las moléculas y toda la bicapa puede describirse como un gel cristalino. (TOMADA DE R. N. ROBERTSON. THE LIVELY MEMBRANES, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, 1983. REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS.)

La temperatura de transición de una bicapa particular depende de la capacidad de las moléculas de lípido para agruparse, lo que a su vez depende de los lípidos particulares con los que está formada. Los ácidos grasos saturados tienen la forma de un bastón recto y flexible. Por otro lado, los ácidos grasos *cis*-insaturados tienen dobleces en los sitios con doble enlace (figs. 2-19 y 4-21). Por consiguiente, los fosfolípidos con cadenas saturadas se agrupan con mayor firmeza que los que poseen cadenas insaturadas. Mientras mayor sea el grado de insaturación de los ácidos grasos de la bicapa, *menor* es la temperatura antes que la bicapa se gelifique. La introducción de un enlace doble en una molécula de ácido esteárico disminuye la temperatura de fusión casi 60°C (cuadro 4-2).[5] Otro factor que influye en la fluidez de la bicapa es la longitud de la cadena de ácidos grasos. Mientras más cortas sean las cadenas de ácidos grasos de un fosfolípido, es menor la temperatura de fusión. El estado físico de la membrana también lo modifica el colesterol. A causa de su orientación dentro de la bicapa (fig. 4-7), las moléculas de colesterol interrumpen el empaque ajustado de las cadenas acilo grasas e interfieren con su movilidad. La presencia de colesterol tiende a suprimir las temperaturas de transición precisas y crea una condición de fluidez intermedia. En términos fisiológicos, el colesterol tiende a aumentar la durabilidad y atenuar la permeabilidad de una membrana.

La importancia de la fluidez de la membrana

¿Qué efecto tiene el estado físico de la bicapa lipídica en las propiedades biológicas de la membrana? La fluidez de la membrana establece un compromiso perfecto entre una estructura rígida y ordenada, en la que la movilidad sería nula, y un líquido completamente fluido, sin viscosidad, en el que los componentes de la membrana no podrían orientarse ni existirían organización estructural ni soporte mecánico. Además, la fluidez permite las interacciones dentro de la membrana. Por ejemplo, este estado de la membrana hace posible que los cúmulos de proteínas de membrana se ensamblen en sitios particulares dentro de la membrana y formen estructuras especializadas, como las uniones intercelulares, los complejos fotosintéticos que captan luz y las sinapsis. Gracias a la fluidez de la membrana, las moléculas que interactúan pueden reunirse, llevar a cabo la reacción necesaria y separarse.

La fluidez también tiene un papel clave en la formación de la membrana, un tema que se trata en el capítulo 8. Las membranas sólo se originan de membranas preexistentes y su crecimiento se logra mediante la inserción de componentes lipídicos y proteicos en la matriz fluida de la hoja membranosa. Muchos de los procesos celulares más elementales, incluidos el movimiento, el crecimiento, la división celular, la formación de uniones entre células, la secreción y la endocitosis, dependen del movimiento de los componentes de la membrana y es probable que resultaran imposibles si las membranas fueran estructuras rígidas y no fluidas.

Cuadro 4-2 Puntos de fusión de ácidos grasos de 18 carbonos frecuentes

Ácido graso	Enlaces dobles *cis*	Punto de fusión (°C)
Ácido esteárico	0	70
Ácido oleico	1	13
Ácido linoleico	2	−9
Ácido linolénico	3	−17
Ácido eicosapentanoico (EPA)*	5	−54

*El EPA tiene 20 carbonos.

[5] El efecto de la saturación del ácido graso en la temperatura de fusión se ilustra con productos alimentarios familiares. Los aceites vegetales permanecen líquidos en el refrigerador, mientras que la margarina es un sólido. Los aceites vegetales contienen ácidos grasos poliinsaturados, en tanto que los ácidos grasos de la margarina se saturaron por un proceso químico que hidrogena los enlaces dobles de los aceites vegetales empleados como materia prima.

Mantenimiento de la fluidez de la membrana

La temperatura interna de la mayoría de los organismos (distintos a las aves y mamíferos) fluctúa con la temperatura del ambiente exterior. Puesto que para muchas actividades es indispensable que las membranas de una célula permanezcan en estado fluido, las células responden a las condiciones cambiantes mediante la alteración de los tipos de fosfolípidos de los cuales se componen. El mantenimiento de la fluidez de la membrana es un ejemplo de homeostasis a nivel celular y puede demostrarse de varias maneras. Por ejemplo, si se reduce la temperatura de un cultivo celular, las células tienen una respuesta metabólica. La respuesta inicial de "emergencia" está mediada por las enzimas que remodelan las membranas, lo que vuelve a la célula más resistente al frío. La remodelación se logra mediante: a) desaturación de enlaces simples en las cadenas acilo grasas para formar enlaces dobles, y b) el recambio de las cadenas entre diferentes moléculas de fosfolípido para producir otra que contenga dos ácidos grasos insaturados, lo que reduce en gran medida la temperatura de fusión de la bicapa. La desaturación de los enlaces sencillos para formar enlaces dobles está catalizada por enzimas llamadas *desaturasas.* El recambio se logra mediante la acción de *fosfolipasas*, que dividen a los ácidos grasos de la base de glicerol, y *aciltransferasas*, que los transfieren a un fosfolípido diferente. Además, la célula cambia los tipos de fosfolípidos que se sintetizan en favor de aquellos que contengan más ácidos grasos insaturados. Como resultado de las actividades de estas enzimas diversas, las propiedades físicas de las membranas de una célula se adaptan a las condiciones ambientales prevalecientes. El mantenimiento de las membranas fluidas mediante el ajuste de la composición de acilos grasos ya se demostró en diversos organismos, incluidos mamíferos en hibernación, peces que viven en estanques cuya temperatura corporal cambia en grado notorio del día a la noche, plantas resistentes al frío y bacterias que viven en manantiales de agua caliente.

La asimetría de los lípidos de membrana

La bicapa de lípidos consiste en dos hojas distintas que tienen una composición lipídica muy diferente. Una línea de experimentos que lleva a esta conclusión aprovecha el hecho de que las enzimas que digieren lípidos no pueden penetrar la membrana plasmática y, en consecuencia, sólo pueden digerir los lípidos que están en la hoja externa de la bicapa. Si se tratan eritrocitos intactos con fosfolipasa para digerir los lípidos, se hidroliza casi 80% de la fosfatidilcolina (PC) de la membrana, pero sólo ataca a 20% de la fosfatidiletanolamina (PE) de la membrana y menos de 10% de la fosfatidilserina (PS). Estos datos indican que, en comparación con la hoja interna, la exterior tiene una concentración relativamente alta de PC (y esfingomielina) y una concentración baja de PE y PS (fig. 4-22). De lo anterior se deduce que puede pensarse que la bicapa de lípidos está compuesta por dos capas sencillas independientes más o menos estables con propiedades físicas y químicas diferentes.

Todos los glucolípidos de la membrana plasmática están en la hoja externa, donde es probable que sirvan como receptores para los ligandos extracelulares. La fosfatidilserina, que se concentra en la hoja interna, tiene una carga negativa en el pH fisiológico, lo que la hace candidata para unirse con residuos de lisina y arginina que tienen carga positiva, como los adyacentes a la hélice alfa de la glucoforina A que cruza la membrana en la figura 4-17. La aparición de PS en la superficie externa de los linfocitos viejos marca estas células para que las destruyan los macrófagos, en tanto que su aparición en la superficie externa de las plaquetas conduce a la coagulación sanguínea. El fosfatidilinositol, que se concentra en la hoja interna, tiene un papel clave en la transferencia de estímulos de la membrana plasmática al citoplasma (sección 15.3).

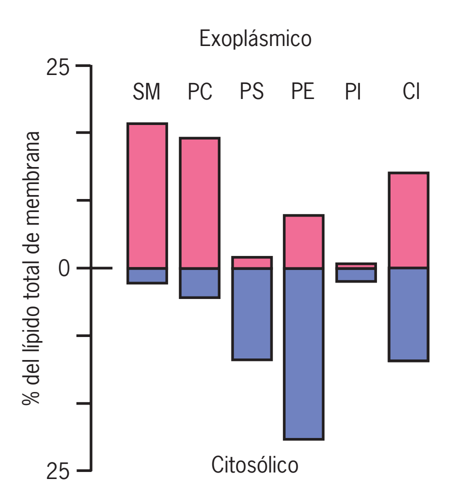
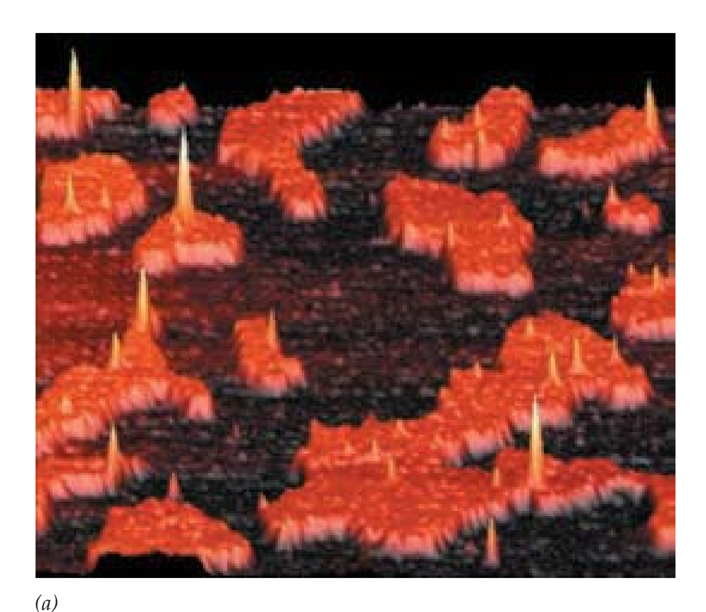


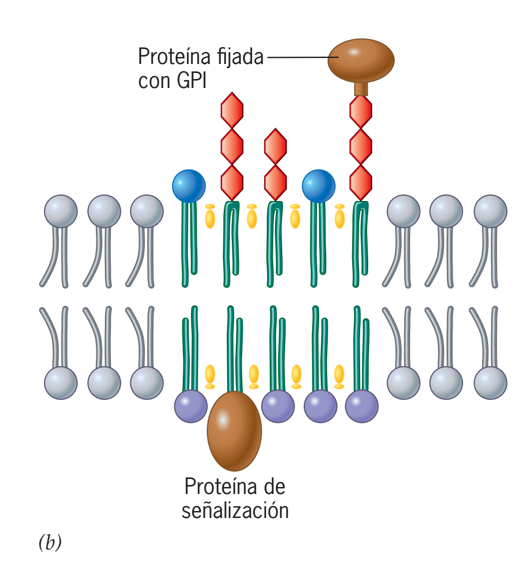
FIGURA 4-22 Distribución asimétrica de los fosfolípidos (y el colesterol) en la membrana plasmática de los eritrocitos humanos. (SM, esfingomielina; PC, fosfatidilcolina; PS, fosfatidilserina; PE, fosfatidiletanolamina; PI, fosfatidilinositol; Cl, colesterol.)

Balsas lipídicas

Periódicamente surge un tema que divide a la comunidad de biólogos celulares en creyentes y no creyentes. El tema de las balsas de lípidos cae en esta categoría. Cuando los lípidos de la membrana se extraen de las células y se usan para crear bicapas lipídicas *artificiales*, colesterol y fosfolípidos tienden a autoensamblarse en microdominios que están más gelificados y altamente ordenados que las regiones circundantes, que consisten en mayor medida en fosfoglicéridos. Debido a sus propiedades físicas distintivas, tales microdominios tienden a flotar dentro del ambiente más fluido y desordenado de la bicapa artificial (fig. 4-23*a*). Como resultado, estos parches de colesterol y esfingolípido se denominan **balsas lipídicas**. Cuando se agregan a estas bicapas artificiales, determinadas proteínas tienden a concentrarse en las balsas, mientras que otras tienden a permanecer fuera de sus fronteras. Las proteínas ancladas a GPI muestran una especial afinidad por las regiones ordenadas de la bicapa (fig. 4-23*a*).

Surge la controversia acerca de si en las células vivas existen tipos similares de balsas lipídicas ricas en colesterol, como la que se ilustra en la figura 4.23*b*. La mayoría de las pruebas a favor de las balsas lipídicas proviene de estudios en que se emplean tratamientos artificiales, como extracción con detergente o agotamiento de colesterol, lo cual hace que los resultados sean difíciles de interpretar. Los intentos por demostrar la presen-


(a)



(b)

FIGURA 4-23 Balsas lipídicas. *a*) Imagen de la superficie de una bicapa de lípidos que contiene fosfatidilcolina, la cual se ve como el fondo negro, y moléculas de esfingomielina, que se organizan en forma espontánea en las balsas de color naranja. Los picos amarillos muestran las posiciones de una proteína fijada con GPI, que se relaciona casi en forma exclusiva con las balsas. Esta imagen se obtuvo mediante un microscopio de fuerza atómica, que mide la altura de varias partes de la muestra al nivel molecular. *b*) Modelo esquemático de una balsa lipídica dentro de una célula. La hoja externa de la balsa consiste sobre todo en colesterol y esfingolípidos (grupos cabeza rojos). Las moléculas de fosfatidilcolina (grupos cabeza azules) con ácidos grasos saturados de cadena larga también tienden a concentrarse en esta región. Una proteína fijada con GPI se localiza en la balsa. Los lípidos de la hoja externa de la balsa tienen un efecto organizador en los lípidos de la hoja interna. Como resultado, los lípidos de la balsa de la hoja interna consisten sobre todo en colesterol y glicerofosfolípidos con colas acilo grasas saturadas. La hoja interna tiende a concentrar las proteínas fijadas con lípidos (como la cinasa Src), que participan en las señales celulares. (*A*, TOMADA DE D. E. SASLOWSKY, ET AL., J BIOL CHEM 277, COVER OF #30, 2002; CORTESÍA DE J. MICHAEL EDWARDSON.)

cia de balsas lipídicas en células vivas por lo general han sido infructuosos, lo cual podría significar que tales balsas no existen o que son tan pequeñas (5 a 25 nm de diámetro) y efímeras que resulta difícil detectarlas con las técnicas actuales. El concepto de balsas de lípido es muy atractivo porque proporciona un medio para introducir orden en un mar aparentemente aleatorio de moléculas de lípido. Se postula que dichas balsas sirven como plataformas flotantes que concentran proteínas específicas, con lo cual organizan la membrana en compartimientos funcionales (fig. 4-23*b*). Por ejemplo, se piensa que las balsas lipídicas proporcionan un ambiente local favorable para que los receptores de superficie celular interactúen con otras proteínas de membrana que transmiten señales desde el espacio extracelular hacia el interior de la célula.

REVISIÓN ?

1. ¿Cuál es la importancia de la insaturación de los ácidos grasos para la fluidez de la membrana y las enzimas que son capaces de disminuir la saturación de los ácidos grasos?
2. ¿A qué se refiere la temperatura de transición de la membrana y cómo la afectan el grado de saturación o la longitud de las cadenas acilo grasas?, ¿qué relevancia tienen estas propiedades en la formación de las balsas lipídicas?
3. ¿Por qué es importante la fluidez de la membrana para la célula?
4. ¿Cómo es posible que los dos lados de una bicapa lipídica tengan diferentes cargas iónicas?

4.6 LA NATURALEZA DINÁMICA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Con base en la descripción previa, resulta aparente que la bicapa lipídica puede existir en un estado relativamente fluido. Como resultado, un fosfolípido puede moverse en sentido lateral dentro de la misma hoja con facilidad considerable. La movilidad de las moléculas individuales de lípidos dentro de la bicapa de la membrana plasmática puede observarse en forma directa al microscopio si se unen las cabezas polares de los lípidos con partículas de oro o compuestos fluorescentes (véase fig. 4-28). Se estima que un fosfolípido puede difundirse de un extremo de una bacteria al otro en uno o dos segundos. En cambio, se requieren horas a días para que una molécula de fosfolípido se mueva a través de la otra hoja. Por lo tanto, de todos los movi-

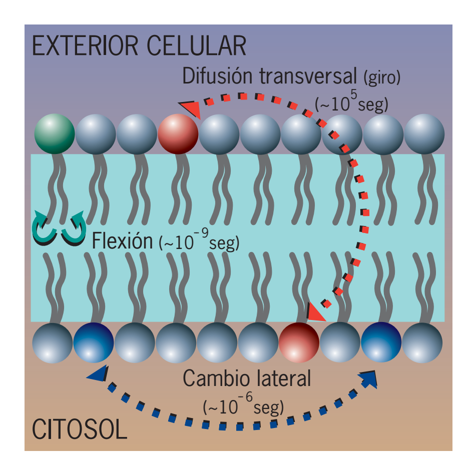


FIGURA 4-24 **Movimientos posibles de los fosfolípidos en una membrana.** Tipos de movimientos que pueden realizar los fosfolípidos de la membrana y tiempos aproximados en los que pueden ocurrir. Mientras que los fosfolípidos se mueven de una hoja a otra con una velocidad muy baja, se difunden con rapidez en sentido lateral dentro de la hoja. Los lípidos que carecen de grupos polares, como el colesterol, pueden moverse rápidamente a través de la bicapa.

mientos posibles que puede efectuar un fosfolípido, este cambio al otro lado de la membrana es el más limitado (fig. 4-24). Este hallazgo no es sorprendente. Para que este giro ocurra, el grupo cabeza hidrófobo del lípido debe pasar por la hoja hidrófoba interna de la membrana, lo cual es desfavorable desde el punto de vista termodinámico. Sin embargo, las células contienen enzimas que mueven activamente determinados fosfolípidos de una hoja a la otra. Estas enzimas participan en el establecimiento de la asimetría lipídica y es posible que también reviertan la baja velocidad del movimiento pasivo a través de la membrana.

Como los lípidos establecen la matriz en la que se incluyen las proteínas integrales de la membrana, el estado físico del lípido es un factor importante de la movilidad de las proteínas integrales. La demostración de que las proteínas integrales pueden moverse dentro del plano de la membrana fue un hito para la formulación del modelo de mosaico fluido. Las propiedades dinámicas de las proteínas de membrana ya se revelaron de diversas maneras.

La difusión de las proteínas de membrana después de la fusión celular

La **fusión celular** es una técnica en la que dos tipos diferentes de células, o células de dos especies distintas, pueden fusionarse para producir una célula con un citoplasma común y una sola membrana plasmática continua. La fusión de las células se induce al hacer que las superficies externas de ellas se vuelva "pegajosa" para que sus membranas plasmáticas se adhieran entre sí. Se puede inducir a las células a fusionarse si se agregan ciertos virus desactivados que se adhieren a la superficie de la membrana, mediante la adición de polietilenglicol o con un ligero choque eléctrico. La fusión celular tiene un papel importante en la biología celular y en la actualidad se utiliza como una técnica invaluable para preparar anticuerpos específicos (sección 18.19).

Los primeros experimentos para demostrar que las proteínas de la membrana podían moverse en el plano de ésta utilizaron la fusión celular y los resultados fueron publicados por Larry Frye y Michael Edidin de la *Johns Hopkins University* en 1970. En sus experimentos fusionaron células humanas y de ratón; luego siguieron las localizaciones de proteínas específicas de la membrana plasmática una vez que ambas se habían convertido en una sola membrana continua. Para seguir la distribución de las proteínas de membrana de ratón o las proteínas de membrana humana durante diferentes momentos después de la fusión, se prepararon anticuerpos contra uno u otro tipo de proteína y se unieron mediante enlaces covalentes con pigmentos fluorescentes. Los anticuerpos contra las proteínas de ratón se unieron en un complejo con un tinte con fluorescencia verde y los anticuerpos contra las proteínas humanas se unieron con uno de fluorescencia roja. Cuando se agregaron los anticuerpos a las

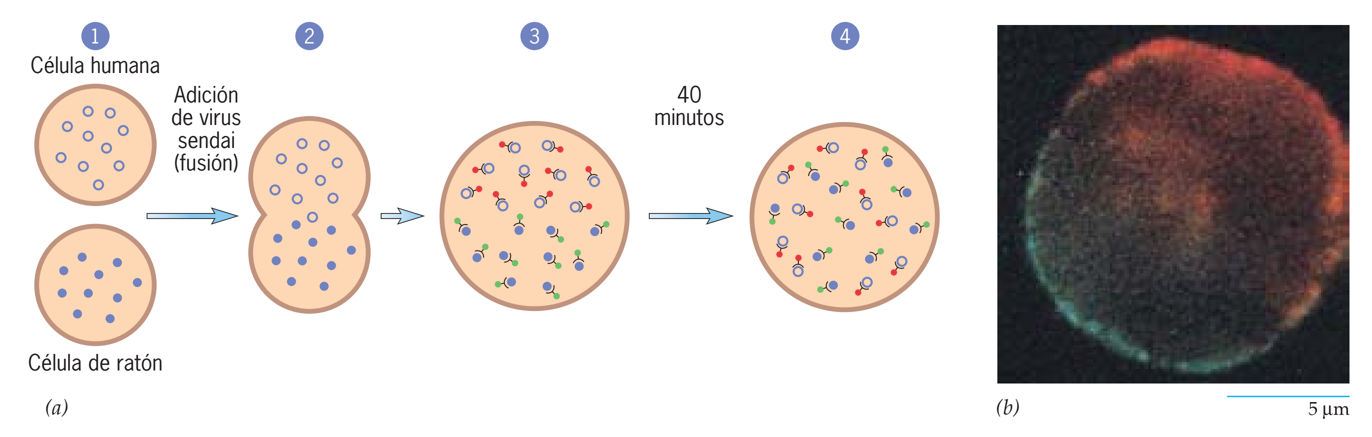


FIGURA 4-25 **Uso de la fusión celular para revelar la movilidad de las proteínas de membrana.** *a*) Esbozo del experimento en el que se fusionaron células humanas y de ratón (pasos 1-2) y se siguió la distribución de las proteínas en la superficie de cada célula en las híbridas a lo largo del tiempo (pasos 3-4). Las proteínas de membrana de ratón están indicadas con círculos rellenos, con círculos huecos las proteínas de membrana humanas. Se vigilaron las localizaciones de las proteínas humanas y de ratón en las membranas plasmáticas de las células híbridas mediante la interacción con anticuerpos fluorescentes rojos y verdes, respectivamente. *b*) Micrografía que muestra una célula fusionada en la que las proteínas de ratón y ser humano aún están en sus hemisferios respectivos (equivalente a la célula híbrida del paso 3 de la parte *a*). (*B*, TOMADA DE L. D. FRYE Y MICHAEL EDIDIN, J CELL SCI 7:328, 1970; CON AUTORIZACIÓN DE THE COMPANY OF BIOLOGISTS LTD.)

células fusionadas, se unieron con las proteínas de ratón o ser humano y pudieron localizarse con el microscopio óptico para fluorescencia (fig. 4-25*a*). Al momento de la fusión, la membrana plasmática se veía con una mitad humana y otra de ratón, es decir, que los dos tipos de proteínas permanecían separados en su propio hemisferio (paso 3, fig. 4-25*a*, *b*). Conforme pasó el tiempo después de la fusión, se observó que las proteínas de membrana se movían en forma lateral dentro de la membrana hacia el hemisferio contrario. Unos 40 minutos después, las proteínas de cada especie estaban distribuidas de manera uniforme en toda la membrana de la célula híbrida (paso 4, fig. 4-25*a*). Si se realizaba el mismo experimento con una temperatura más baja, la viscosidad de la bicapa de lípidos aumentaba y la movilidad de las proteínas en la membrana disminuía. Estos experimentos iniciales con la fusión celular dieron la impresión de que las proteínas integrales de la membrana eran capaces de moverse sin restricciones. Como se ve un poco más adelante, estudios posteriores mostraron que la dinámica de la membrana es un tema mucho más complejo de lo que parecía al principio.

Restricciones de la movilidad de las proteínas y lípidos

Existen varias técnicas que permiten a los investigadores seguir los movimientos de las moléculas en las membranas de células vivas con el microscopio óptico. En una técnica llamada ***recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueado*** **(FRAP)**, que se ilustra en la figura 4-26*a*, los componentes integrales de la membrana de células cultivadas se marcan primero con un tinte fluorescente. Una proteína de membrana en particular puede marcarse con una sonda específica, como un anticuerpo fluorescente. Una vez marcadas, las células se colocan al microscopio y se irradian con un haz láser muy intenso y dirigido que blanquea las moléculas fluorescentes en su trayecto, lo que deja una mancha circular (casi siempre de 1 µm de diámetro) en la superficie de la célula que carece de fluorescencia. Si las proteínas marcadas en la membrana son móviles, los movimientos aleatorios de estas moléculas deben producir una reaparición gradual de la fluorescencia en el círculo radiado. La velocidad con la que se recupera la fluorescencia (fig. 4-26*b*) suministra una medición directa del índice de difusión (expresado como coeficiente de difusión, *D*) de las moléculas móviles. La extensión de la recuperación de la fluorescencia (expresada como porcentaje de la intensidad original) proporciona una medida del porcentaje de las moléculas marcadas que tienen la libertad de difundirse.

Los estudios iniciales que utilizaron FRAP sugirieron que: a) las proteínas de membrana se movían con mucha mayor lentitud en una membrana plasmática que en una bicapa lipídica pura y b) que una fracción significativa de las proteínas de membrana (30 a 70%) no era libre de difundirse de regreso al círculo radiado. No obstante, la técnica FRAP tiene sus limitaciones. Sólo puede seguir el movimiento promedio de una cantidad relativamente grande de moléculas marcadas (cientos a miles) a medida que se difunden en una distancia relativamente grande (p. ej., 1 µm). Como resultado, los investigadores que utilizan la técnica FRAP no pueden distinguir entre proteínas que en realidad están inmóviles y las que sólo difunden a una distancia limitada en el tiempo permitido. Para solventar estas limitaciones se desarrollaron técnicas alternativas que permiten a los investigadores observar los movimientos de moléculas

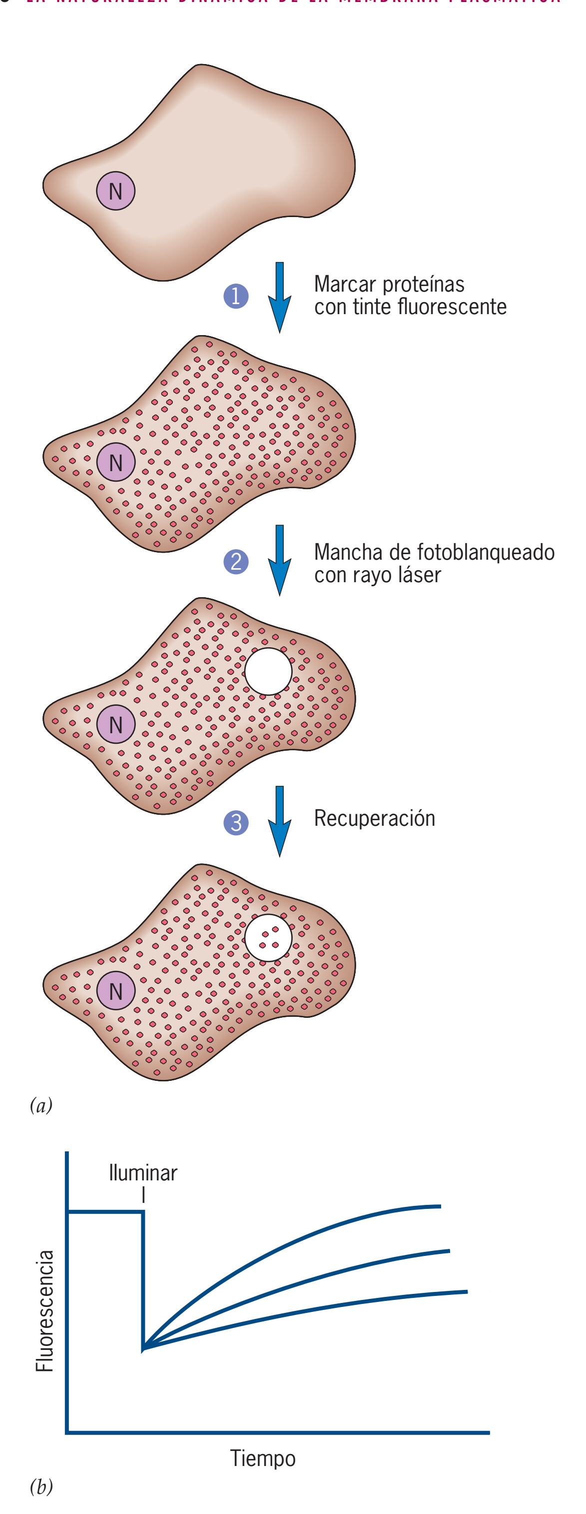


FIGURA 4-26 Medición de las velocidades de difusión de las proteínas de membrana mediante la recuperación de fluorescencia después del fotoblanqueado (FRAP). *a*) En esta técnica se marca primero un componente particular de la membrana con un tinte fluorescente (paso 1). Luego se aplica radiación a una pequeña región de la superficie para blanquear las moléculas de tinte (paso 2) y con el tiempo se recupera la fluorescencia en la región blanqueada (paso 3). (N representa el núcleo celular.) *b*) La velocidad de recuperación de la fluorescencia en el punto iluminado varía según sean las proteínas que se rastreen. La velocidad de recuperación se relaciona con el coeficiente de difusión de la proteína marcada con fluorescencia.

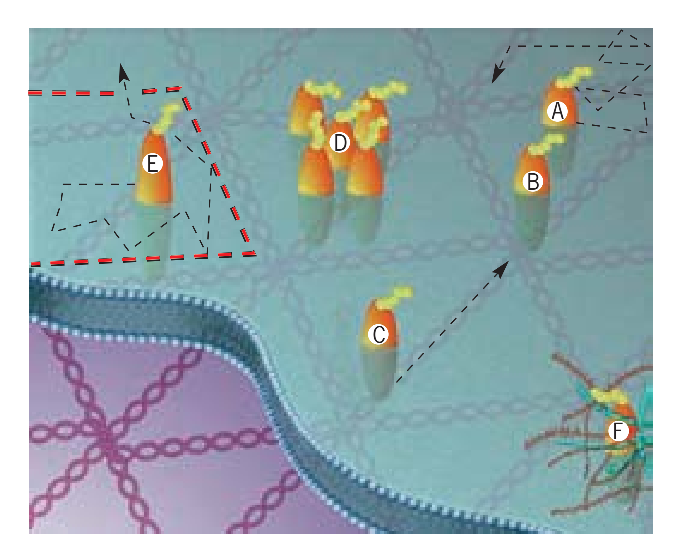


FIGURA 4-27 Patrones de movimiento de las proteínas integrales de la membrana. De acuerdo con el tipo celular y las condiciones, las proteínas integrales de membrana pueden tener varios tipos distintos de movilidad. La proteína A es capaz de difundirse en forma aleatoria por la membrana, aunque su velocidad de movimiento puede ser limitada. La proteína B está inmovilizada por su interacción con el esqueleto de la membrana. La proteína C se mueve en una dirección particular como resultado de su interacción con una proteína motora en la superficie citoplásmica de la membrana. El movimiento de la proteína D está restringido por otras proteínas integrales de la membrana. El movimiento de la proteína E se limita por las vallas formadas por las proteínas del esqueleto de la membrana, pero dicha proteína puede saltar a compartimientos adyacentes a través de aberturas transitorias en una cerca; el movimiento de la proteína F lo limitan los materiales extracelulares.

individuales de proteínas en distancias muy cortas y determinar cómo pudieran limitarse.

En el **rastreo de partículas individuales (SPT)** se marcan moléculas individuales de proteínas de membrana, casi siempre con partículas de oro cubiertas con anticuerpo (cerca de 40 nm de diámetro) y se siguen los movimientos de las moléculas marcadas mediante microscopia en video asistida por computadora (sección 18.1). Los resultados de estos estudios dependen a menudo de la proteína particular que se estudia. Por ejemplo:

- Algunas proteínas de membrana se mueven en forma aleatoria por toda la membrana (fig. 4-27, proteína A), aunque casi siempre a velocidades mucho menores de las medidas en una bicapa lipídica artificial. (Si la movilidad de la proteína se basara sólo en los parámetros físicos como la viscosidad del lípido y el tamaño de la proteína, se esperaría que las proteínas migraran con coeficientes de difusión cercanos a 10^{-8} a 10^{-9} cm^2/seg en lugar de 10^{-10} a 10^{-12} cm^2/seg, como se observa para las moléculas de este grupo.) Las razones para el menor coeficiente de difusión aún son tema de debate.
- Algunas proteínas de membrana no se mueven y se consideran inmovilizadas (fig. 4-27, proteína B).
- En algunos casos, se observa que una especie particular de proteína se mueve en forma muy dirigida (no al azar) hacia una u otra parte de la célula (fig. 4-27, proteína C). Por ejemplo, es probable que una proteína de membrana particular tienda a moverse hacia el extremo guía o el final de una célula en movimiento.
- En la mayoría de los estudios, la mayor fracción de las especies de proteínas tienen movimientos aleatorios (browniano) dentro de la membrana con velocidades consistentes con la difusión libre (coeficientes de difusión cercanos a 5×10^{-9} cm^2/seg), pero las moléculas son incapaces de migrar libremente más de unas décimas de micra. La difusión de grandes distancias ocurre, pero con velocidades más bajas parece que se debe a la presencia de un sistema de barreras. Estas barreras se describen en las secciones siguientes.

Control de la movilidad de las proteínas de membrana En apariencia, las proteínas de la membrana plasmática no son del todo libres de moverse al azar en el "mar" de lípido, sino que están sometidas a diversas influencias que afectan su movilidad. Algunas membranas son ricas en proteínas, por lo que los movimientos aleatorios de una molécula están impedidos por sus vecinas (fig. 4-27, proteína D). Se piensa que la influencia más importante para una proteína integral de la membrana se ejerce justo por debajo de la membrana, sobre su cara citoplásmica. Las membranas plasmáticas de muchas células tienen una red fibrilar o "esqueleto de la membrana", que consiste en proteínas periféricas situadas en la superficie citoplásmica de la membrana. Cierta proporción de las moléculas de proteínas integrales de la membrana está fijada al esqueleto de la membrana (fig. 4-27, proteína B) o restringida de otra manera por este esqueleto.

Se ha obtenido información sobre la presencia de barreras de membrana con una técnica innovadora que permite a los investigadores atrapar proteínas integrales y arrastrarlas por la membrana plasmática con una fuerza conocida. Esta técnica utiliza un aparato llamado *pinzas ópticas* y aprovecha las diminutas fuerzas ópticas que se generan con un rayo láser enfocado. Las proteínas integrales bajo estudio se marcan con cuentas cubiertas de anticuerpo que sirven como agarraderas que pueden sujetarse con el rayo láser. Por lo general se encuentra que las pinzas ópticas pueden arrastrar una proteína integral una distancia limitada antes de que la proteína encuentre una barrera que la libera de la sujeción del láser. En cuanto se libera, la proteína casi siempre regresa de inmediato, lo que sugiere que las barreras son estructuras elásticas.

Una forma de estudiar los factores que afectan la movilidad de las proteínas de membrana consiste en hacer modificaciones genéticas en las células para que produzcan proteínas de membrana alteradas. Las proteínas integrales cuyas porciones citoplásmicas se borraron por manipulación genética se mueven a menudo *distancias* mucho mayores que sus contrapartes intactas, lo que indica que las barreras residen en el lado citoplásmico de la membrana. Estos hallazgos sugieren que el esqueleto subyacente de la membrana forma una red de "cercas" alrededor de porciones de la membrana, lo que crea compartimientos que limitan la distancia que puede viajar una proteína integral (fig. 4-27, proteína E). Las proteínas se mueven y salvan los límites entre un compartimiento y otro a través de hendiduras en las cercas. Se cree que estas aberturas aparecen y desaparecen mediante el ensamble y desensamble de partes de la red. Los compartimientos de la membrana pueden mantener combinaciones específicas de proteínas en estrecha proximidad para facilitar su interacción.

Las proteínas integrales que carecen de la porción que debiera proyectarse hacia el espacio extracelular se mueven con una *velocidad* mucho mayor que la versión del tipo nativo de

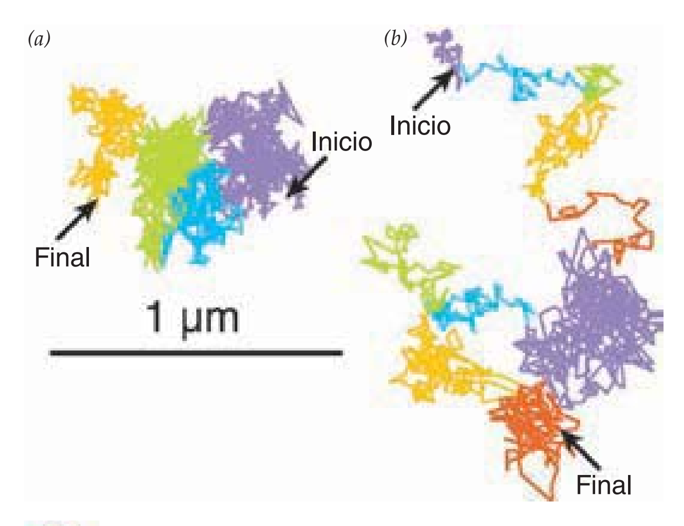


FIGURA 4-28 Demostración experimental de que la difusión de los fosfolípidos dentro de la membrana plasmática es limitada. *a*) El rastro de un solo fosfolípido no saturado marcado se sigue durante 56 milisegundos mientras se difunde dentro de la membrana plasmática de un fibroblasto de rata. Los fosfolípidos se difunden con libertad en un compartimiento limitado antes de saltar a un compartimiento vecino. La velocidad de difusión dentro de un compartimiento es tanta como se esperaría del movimiento browniano sin restricciones. Sin embargo, la velocidad total de difusión del fosfolípido parece menor porque la molécula debe saltar una barrera para continuar su movimiento. El movimiento del fosfolípido dentro de cada compartimiento está indicado por un solo color. *b*) El mismo experimento mostrado en *a* se realizó durante 33 mseg en una bicapa artificial que carece de las "cercas de alambre" presentes en una membrana celular. En este caso, la trayectoria mucho más abierta y extendida del fosfolípido puede explicarse con el movimiento browniano simple y sin limitaciones. Con base en la comparación, se asignaron compartimientos falsos en *b* y se indicaron con colores diferentes. (TOMADA DE TAKAHIRO FUJIWARA, ET AL., CORTESÍA DE AKIHIRO KUSUMI, J CELL BIOL 157:1073, 2002; CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DE ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

la proteína. Este hallazgo sugiere que el movimiento de una proteína transmembranosa por la bicapa se vuelve más lento por la presencia de materiales extracelulares que puedan enredar la porción externa de la molécula proteica (véase fig. 4-27, proteína F).

Movilidad de lípidos de membrana Las proteínas son moléculas enormes, por lo que no es sorprendente que su movimiento dentro de la bicapa de lípidos esté limitado. En comparación, los fosfolípidos son moléculas pequeñas que constituyen la trama misma de la bicapa de lípidos. Podría esperarse que sus movimientos fueran libres, aunque varios estudios indican que la difusión de los fosfolípidos también está restringida. Cuando se marcan las moléculas individuales de fosfolípidos de una membrana plasmática y se siguen mediante video microscópico de alta velocidad, se advierte que están confinados por periodos muy breves y luego saltan de un área confinada a otra. La figura 4-28*a* muestra el trayecto que toma un fosfolípido individual dentro de la membrana plasmática en un periodo de 56 milisegundos. El análisis por computadora indica que el fosfolípido se difunde con libertad dentro de un compartimiento (sombreado en púrpura) antes de saltar la "cerca" al compartimiento vecino (sombreado en azul) y luego sobre otra cerca para llegar al compartimiento adyacente (sombreado en verde), y así continúa. El tratamiento de la membrana con agentes que desbaratan el esqueleto subyacente de la membrana elimina algunas de las cercas que restringen la difusión del fosfolípido. Pero si el esqueleto de la membrana se encuentra por debajo de la bicapa de lípidos, ¿cómo puede interferir con el movimiento del fosfolípido? Los autores de este estudio han conjeturado que las cercas se construyen con filas de proteínas integrales de membrana cuyos dominios citoplásmicos se unen con el esqueleto de la membrana. Esto no difiere mucho del confinamiento de caballos o vacas en un cercado cuyos postes están enterrados en el suelo subyacente.

Dominios de membrana y polaridad celular La mayoría de los estudios sobre dinámica de membrana, como los aquí descritos, se realizan con la membrana plasmática relativamente homogénea situada en la superficie superior o inferior de una célula que se encuentra en una caja de cultivo. Sin embargo, la mayor parte de las membranas posee diversas variaciones en su composición y movilidad proteicas, sobre todo en células cuyas diversas superficies tienen distintas funciones. Por ejemplo, las células epiteliales que recubren la pared intestinal o constituyen los túbulos microscópicos del riñón son células muy polarizadas que en sus distintas superficies realizan funciones diferentes (fig. 4-29). Los estudios indican que la membrana plasmática apical,

Membrana plasmática apical
- regulación de ingreso de nutrimentos y agua
- secreción regulada
- protección

Membrana plasmática lateral
- contacto y adhesión celulares
- comunicación celular

Membrana basal
- contacto con el subestrato celular
- generación de gradientes iónicos

Glucosa
Na^+
Disacárido
Monosacárido

FIGURA 4-29 Funciones diferenciadas de la membrana plasmática en una célula epitelial. La superficie apical de esta célula epitelial intestinal contiene proteínas integrales que funcionan en el transporte de iones y la hidrólisis de disacáridos, como son la sacarosa y la lactosa; la superficie lateral posee proteínas integrales que participan en la interacción entre las células y la superficie basal incluyendo proteínas integrales que participan en la relación de la célula con la membrana basal subyacente.

que absorbe en forma selectiva sustancias de la luz, tiene enzimas distintas a la membrana plasmática lateral, que interactúa con las células epiteliales vecinas, o distintas también a las de la membrana basal que se adhiere al sustrato extracelular subyacente (una *membrana basal*). En otros ejemplos, los receptores para neurotransmisores se concentran en regiones de la membrana plasmática localizada dentro de las sinapsis (véase fig. 4-55) y los receptores para las lipoproteínas de baja densidad se concentran en parches de la membrana plasmática especializados en facilitar su interiorización (véase fig. 8-38).

De todos los tipos de células de mamíferos, los espermatozoides tienen la estructura más diferenciada. Un espermatozoide maduro puede dividirse en cabeza, pieza central y cola, cada una con funciones especializadas propias. Aunque se divide en varias partes distintas, el espermatozoide está cubierto con una membrana plasmática *continua* que, como revelan muchas técnicas, consiste en un mosaico de diferentes tipos de dominios localizados. Por ejemplo, cuando el espermatozoide se trata con varios anticuerpos específicos, cada anticuerpo se combina con la superficie de la célula con un patrón topográfico único que refleja la distribución de los antígenos proteínicos particulares reconocidos por ese anticuerpo en la membrana plasmática (fig. 4-30).

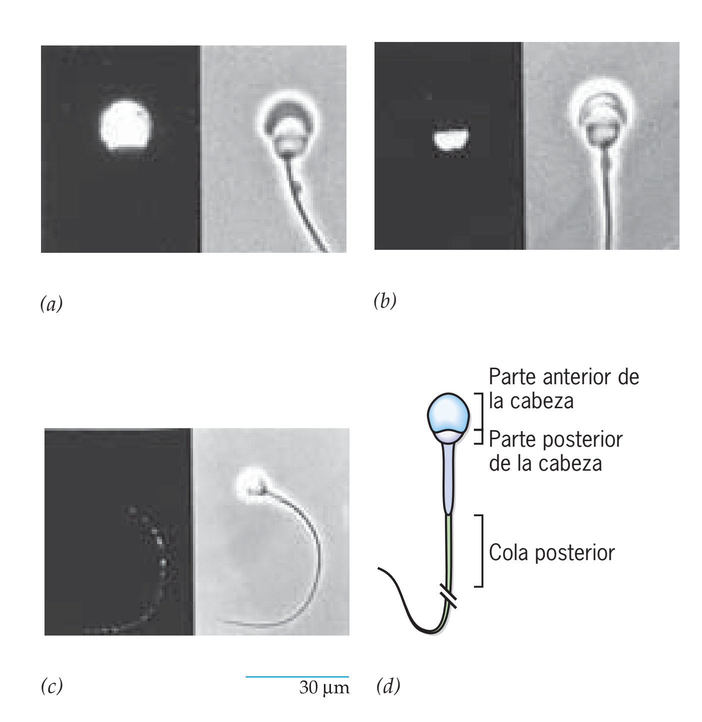


FIGURA 4-30 Diferenciación de la membrana plasmática del espermatozoide humano revelada por anticuerpos fluorescentes. *a-c*) Tres pares de micrografías que muestran la distribución de una proteína particular en la superficie celular revelada por un anticuerpo fluorescente unido. Las tres proteínas se localizan en distintas partes de la membrana espermática continua. Cada par de fotografías muestra el patrón de fluorescencia del anticuerpo unido y una micrografía de la fase de la misma célula. *d*) Diagrama que resume la distribución de las proteínas. (*A-C*, TOMADAS DE DIANA G. MYLES, PAUL PRIMAKOFF Y ANTHONY R. BELLVÉ, CELL 23:434, 1981, CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS.)

El eritrocito: un ejemplo de estructura de la membrana plasmática

De los diversos tipos de membranas, la membrana plasmática del eritrocito humano (glóbulo rojo) es el más estudiado y mejor comprendido (fig. 4-31). La preferencia por esta membrana tiene varias razones. La obtención de estas células no es costosa y están disponibles en enormes cantidades en la sangre entera. Ya se encuentran como células independientes y no es necesario separarlas de un tejido complejo. Estas células son sencillas en comparación con otros tipos celulares, carecen de membranas nucleares y citoplásmicas que siempre contaminan las preparaciones de membrana plasmática de otras células. Además, se pueden obtener membranas plasmáticas *intactas* de eritrocitos purificadas tan sólo con colocar las células en solución salina diluida (hipotónica). Las células responden a este choque osmótico con la captación de agua y se hinchan, fenómeno conocido como ***hemólisis***. A medida que aumenta la superficie de cada célula, ésta presenta fugas y el contenido, compuesto casi en su totalidad por hemoglobina disuelta, sale de la célula para dejar un "fantasma" de membrana plasmática (fig. 4-31*b*).

Una vez que se aíslan las membranas plasmáticas de los eritrocitos, las proteínas pueden solubilizarse y separarse entre sí (fraccionarse), lo que brinda una mejor idea de la diversidad de las proteínas dentro de la membrana. El fraccionamiento de las proteínas de la membrana puede efectuarse mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia del detergente iónico sulfato de dodecilo sódico (SDS). (La técnica de SDS-PAGE se describe en la sección 18.7.) El SDS mantiene solubles las proteínas integrales y además agrega una gran cantidad de cargas negativas a las proteínas con las que se relaciona. Como el número de moléculas cargadas con SDS por unidad de peso de proteína tiende a ser relativamente constante, las moléculas se separan entre sí de acuerdo con su peso molecular. Las proteínas más grandes se mueven con mayor lentitud por el tamiz molecular del gel. Las proteínas principales de la membrana del eritrocito se separan en casi una docena de bandas conspicuas con la técnica SDS-PAGE (fig. 4-31*c*). Entre las proteínas existen diversas enzimas (incluida la deshidrogenasa de gliceraldehído 3-fosfato, una de las enzimas de la glucólisis), proteínas de transporte (para iones y azúcares) y proteínas del esqueleto celular (p. ej., espectrina).

Proteínas integrales de la membrana eritrocitaria La figura 4-31*d* incluye un modelo de la membrana plasmática del eritrocito que muestra sus principales proteínas. Las proteínas integrales más abundantes de esta membrana son un par de proteínas que cruzan la membrana y contienen carbohidrato llamadas banda 3 y glucoforina A. La gran densidad de estas proteínas en la membrana es evidente en las micrografías por congelación y fractura de la figura 4-13. La banda 3, que obtuvo su nombre de su posición en el gel electroforético (fig. 4-31*c*), está presente como dímero compuesto por dos subunidades idénticas (un ***homodímero***). Cada subunidad cruza la membrana por lo menos 12 veces y contiene una cantidad relativamente pequeña de carbohidrato (6 a 8% del peso de la molécula). La proteína banda 3 sirve como canal para el intercambio pasivo de aniones a través de la membrana. Conforme la sangre circula por los tejidos, el dióxido de carbono se

(a) 7 µm

(b)

PERIFÉRICA

INTEGRAL

Mayor

Menor

Espectrina

Anquirina

ATP-asa

AChE

Banda 3

Glucoforina A

Banda 4.1

Banda 4.2

Actina

G3PD

Banda 7

Banda 4.1

(c)

Anquirina

Actina

Tropomiosina

Banda 4.1

Espectrina

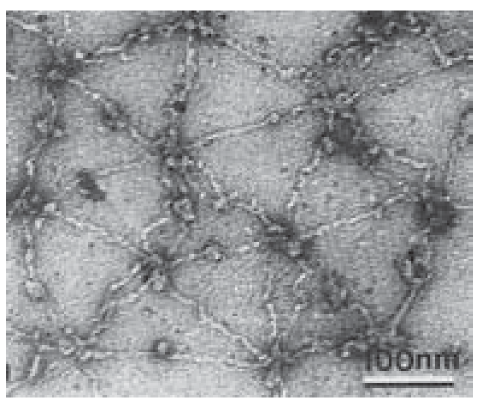
— α

— β

Banda 3

Glucoforina A

(d)



(e)

FIGURA 4-31 Membrana plasmática del eritrocito humano. *a*) Micrografía electrónica de barrido de eritrocitos humanos. *b*) Micrografía que muestra los fantasmas de la membrana plasmática que se aislaron al permitir que los eritrocitos se hincharan y hemolizaran como se describe en el texto. *c*) Los resultados de la electroforesis en gel con SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) se emplearon para fraccionar las proteínas de la membrana eritrocitaria, que se identifican al lado del gel. *d*) Un modelo de membrana plasmática eritrocitaria, vista desde la superficie interna, muestra las proteínas integrales incrustadas en la bicapa de lípidos y la disposición de las proteínas periféricas que constituyen el esqueleto interno de la membrana. El dímero de banda 3 que se muestra está simplificado. La proteína 4.1 estabiliza los complejos actina-espectrina. *e*) Micrografía electrónica que revela la disposición de las proteínas en el esqueleto de la membrana interna. (*A*, TOMADA DE FRANÇOIS M. M. MOREL, RICHARD F. BAKER Y HAROLD WAYLAND, J CELL BIOL 48:91, 1971. *B*, CORTESÍA DE JOSEPH F. HOFFMAN. *C*, REPRODUCIDA CON AUTORIZACIÓN DE V. T. MARCHESI, H. FURTHMAYR Y M. TOMITA, ANNU REV BIOCHEM, VOL. 45; © 1976 POR ANNUAL REVIEWS INC. *D*, TOMADA DE D. VOET Y J. G. VOET, BIOCHEMISTRY, 2ND ED. © 1995, JOHN WILEY & SONS, INC. *E*, TOMADA DE SHIH-CHUN LIU, LAURA H. DERICK Y JIRI PALEK, J CELL BIOL 104:527, 1987. *A*, *E*, CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DE ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

disuelve en la fracción líquida de la sangre (el plasma) y sufre la reacción siguiente:

$$H_2O + CO_2 \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow HCO_3^- + H^+$$

Los iones bicarbonato (HCO_3^-) entran al eritrocito a cambio de los iones cloro, los cuales salen de la célula. En los pulmones, donde se libera el dióxido de carbono, la reacción se invierte y los iones de bicarbonato salen del eritrocito a cambio de iones cloro. Parece que el movimiento recíproco de HCO_3^- y Cl^- ocurre a través de un canal en el centro de cada dímero de banda 3.

La glucoforina A fue la primera proteína de membrana de la que se conoció su secuencia de aminoácidos. La disposición de la cadena polipeptídica de la glucoforina A dentro de la membrana plasmática se muestra en la figura 4-17. (Otras glucoforinas relacionadas, B, C, D y E, también están presentes en la membrana en concentraciones mucho menores.) Como la banda 3, la glucoforina A también está presente en la membrana como un dímero. A diferencia de la banda 3, la glucoforina A cruza la membrana sólo una vez y contiene una cubierta ramificada de carbohidrato que consiste en 16 cadenas de oligosacáridos que en conjunto constituyen cerca de 60% del peso de la molécula. Se cree que la función principal de las glucoforinas se basa en la gran cantidad de cargas negativas contenidas en el ácido siálico, el residuo de azúcar en el extremo de cada cadena de carbohidrato. A causa de estas cargas, los eritrocitos se repelen entre sí, lo cual impide que las células se aglomeren cuando circulan por los diminutos vasos sanguíneos del cuerpo. Vale la pena señalar que las personas que carecen de glucoforina A y B en los eritrocitos no tienen efectos adversos por su ausencia. Al mismo tiempo, las proteínas banda 3 de estas personas están más glucosiladas, lo que parece compensar las cargas negativas faltantes necesarias para prevenir la interacción entre los eritrocitos. La glucoforina también es el receptor que utilizan los protozoarios que causan el paludismo, lo que suministra una vía de entrada hacia el eritrocito. Por consiguiente, se cree que las personas cuyos eritrocitos carecen de glucoforina A y B están protegidas contra el paludismo. Las diferencias de la secuencia de aminoácidos de la glucoforina determinan si una persona tiene tipo sanguíneo MM, MN o NN.

El esqueleto de la membrana eritrocitaria Las proteínas periféricas de la membrana plasmática del eritrocito están localizadas en su superficie interna y forman un esqueleto fibrilar de la membrana (fig. 4-31*d, e*) que tiene un papel crucial para mantener la forma bicóncava del eritrocito y limitar el movimiento de las proteínas integrales de la membrana. El principal componente del esqueleto es una proteína fibrosa alargada llamada *espectrina*. La espectrina es un heterodímero de unos 100 nm de largo, formado por una subunidad alfa y una beta que se enrollan una sobre la otra. Dos de estas moléculas diméricas se unen por sus cabezas y forman un filamento tetramérico de 200 nm de largo, flexible y elástico. La espectrina se une con la superficie interna de la membrana mediante enlaces no covalentes con otra proteína periférica, la *anquirina* (las esferas verdes de la figura 4-31*d*), que a su vez se une en forma no covalente con el dominio citoplásmico de una molécula de banda 3. Como resulta evidente en las figuras 4-31*d* y *e*, los filamentos de espectrina están organizados en conjuntos hexagonales o pentagonales. Este tipo de red se construye mediante la unión de ambos extremos de cada filamento de espectrina para formar un cúmulo de proteínas que incluye un filamento corto de *actina* y *tropomiosina*, proteínas que intervienen en las actividades de contracción. Se han estudiado varias enfermedades genéticas (*anemias hemolíticas*) caracterizadas por eritrocitos frágiles de forma anormal hasta que se hallaron mutaciones en la anquirina o la espectrina.

Si se retiran las proteínas periféricas de los fantasmas de eritrocitos, la membrana se fragmenta en pequeñas vesículas, lo que indica que la red proteica interna es necesaria para mantener la integridad de la membrana. Los eritrocitos son células circulantes que se oprimen bajo la presión cuando pasan por capilares microscópicos con diámetro mucho menor al de los eritrocitos mismos. Para cruzar estos conductos tan estrechos, y para hacerlo día tras día, el eritrocito debe ser muy deformable, durable y capaz de soportar fuerzas en cizalla que tienden a romperlo. La red de espectrina-actina confiere a la célula la fuerza, elasticidad y flexibilidad necesarias para realizar esta función demandante.

Cuando se descubrió el esqueleto de la membrana del eritrocito, se pensó que era una estructura única adecuada para la forma particular y las necesidades mecánicas de este tipo de célula. Sin embargo, conforme se examinaron otras células, se encontraron tipos similares de esqueletos de membrana que contienen miembros de las familias de la espectrina y la anquirina, lo que indica que los esqueletos de la membrana interna son una estructura difundida. Por ejemplo, la distrofina es un miembro de la familia de la espectrina que se halla en el esqueleto de la membrana de las células musculares. Las mutaciones en la distrofina son la causa de la distrofia muscular, una enfermedad devastadora que incapacita y mata a los niños. Como en el caso de la fibrosis quística (pág. 160), las mutaciones más debilitantes son las que causan la ausencia completa de la proteína en la célula. Parece que las membranas plasmáticas de las células musculares que carecen de distrofina se destruyen como consecuencia del estrés mecánico que deben soportar cuando el músculo se contrae. Como resultado, las células musculares mueren y al final ya no se reponen.

REVISIÓN ?

1. Describa dos técnicas para medir la velocidad de difusión de una proteína de membrana específica.
2. Compare y diferencie los tipos de movilidad proteica que se muestran en la figura 4-27.
3. Describa dos funciones principales de las proteínas integrales y periféricas de la membrana del eritrocito.
4. Compare la velocidad de difusión lateral de un lípido con la del giro. ¿Cuáles son las razones que explican la diferencia?

4.7 EL MOVIMIENTO DE SUSTANCIAS A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS CELULARES

Como el contenido de una célula está rodeado por su membrana plasmática, toda la comunicación entre la célula y el medio extracelular debe estar regulada por esta estructura. En cierto modo, la membrana plasmática posee una función doble. Por un lado, debe retener los materiales disueltos de la célula para que no se escapen hacia el ambiente, mientras que por otro lado debe permitir el intercambio necesario de materiales al interior y exterior de la célula. La bicapa lipídica de la membrana es una estructura ideal para prevenir la pérdida de los solutos cargados y polares de la célula. Por consiguiente, debe haber alguna provisión especial que permita el movimiento de nutrimentos, iones, productos de desecho y otros compuestos, hacia el interior y exterior de la célula. Hay dos medios básicos para el movimiento de sustancias a través de una membrana: en forma pasiva por difusión y en forma activa mediante un proceso de transporte con gasto energético. Ambos tipos de movimientos permiten el flujo neto de un ion o compuesto particular. El término *flujo neto* indica que el movimiento de la sustancia hacia el interior de la célula (*entrada*) y exterior (*salida*) de la célula no está equilibrado, sino que uno excede al otro.

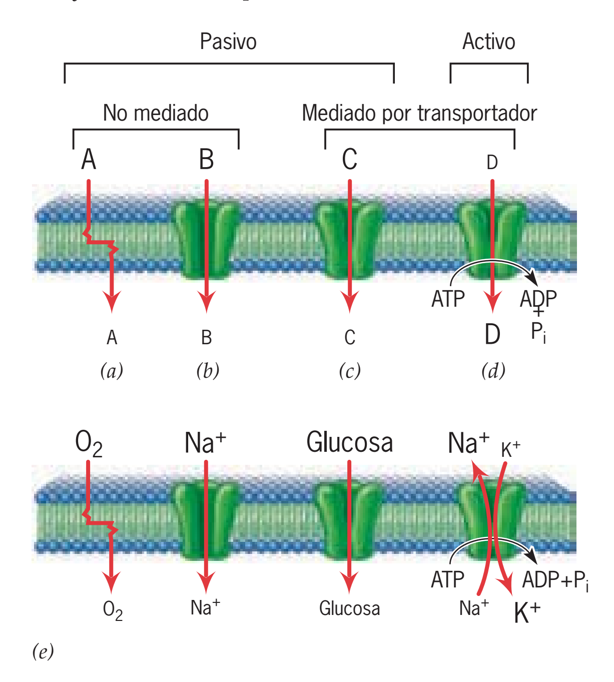


FIGURA 4-32 Cuatro mecanismos básicos por los cuales las moléculas de soluto se mueven a través de la membrana. Los tamaños relativos de las letras indican las direcciones de los gradientes de concentración. *a*) Difusión simple a través de la bicapa, que siempre avanza de la mayor concentración a la menor. *b*) Difusión simple por un canal acuoso formado dentro de una proteína integral de membrana o un cúmulo de estas proteínas. Como en *a*, el movimiento siempre es en favor de un gradiente de concentración. *c*) Difusión facilitada en la que las moléculas de soluto se unen de manera específica con un portador proteico en la membrana (transportador facilitador). Como en *a* y en *b*, el movimiento siempre va de la concentración alta a la baja. *d*) Transporte activo mediante un transportador proteico con un sitio de unión específico que sufre un cambio en la afinidad y se impulsa con la energía que libera un proceso exergónico, como la hidrólisis de ATP. El movimiento ocurre contra un gradiente de concentración. *e*) Ejemplos de cada tipo de mecanismo como suceden en la membrana de un eritrocito.

Se conocen varios procesos diferentes mediante los cuales las sustancias cruzan las membranas: difusión simple por la bicapa de lípidos; difusión simple por un canal acuoso recubierto con proteína; difusión facilitada por un transportador proteico, y transporte activo, que requiere una "bomba" de proteína impulsada por energía capaz de mover sustancias contra un gradiente de concentración (fig. 4-32). Se considera cada uno en su momento, pero primero se describe la energética del movimiento de solutos.

La energética del movimiento de solutos

La **difusión** es un proceso espontáneo en el que una sustancia se mueve de una región de alta concentración a otra con baja concentración, lo que al final elimina la diferencia de concentración entre las dos regiones. Como se describe en la página 87, la difusión depende del movimiento térmico aleatorio de solutos y es un proceso exergónico impulsado por un aumento de la entropía. La discusión siguiente se limita a la difusión de sustancias a través de membranas.

El cambio de energía libre que ocurre cuando un soluto sin carga (un no electrólito) se difunde a través de una membrana depende de la magnitud del gradiente de concentración, esto es, la diferencia de la concentración a cada lado de la membrana. La siguiente relación describe el movimiento de un no electrólito *hacia dentro* de la célula:

$$\Delta G = RT \ln \frac{[C_i]}{[C_o]}$$

$$\Delta G = 2.303\ RT \log_{10} \frac{[C_i]}{[C_o]}$$

donde ΔG es el cambio de energía libre (sección 3.1), R la constante de gas, T la temperatura absoluta del soluto y $[C_i]/[C_o]$ la proporción entre la concentración del soluto en las superficies interna (i) y externa (o) de la membrana. A 25°C,

$$\Delta G = 1.4\ \text{kcal/mol} \cdot \log_{10} \frac{[C_i]}{[C_o]}$$

Si la proporción $[C_i]/[C_o]$ es menor a 1.0, el logaritmo de la proporción es negativo, ΔG es negativo y la entrada neta de soluto está favorecida desde el punto de vista termodinámico (exergónico). Por ejemplo, si la concentración externa de soluto es 10 veces mayor a la interna, $\Delta G = -1.4$ kcal/mol. Por lo tanto, el mantenimiento del gradiente de concentración de 10 veces representa un almacenamiento de 1.4 kcal/mol. Conforme el soluto entra a la célula, disminuye el gradiente de concentración, la energía almacenada se disipa y ΔG decrece hasta que, en equilibrio, es de cero. (Para calcular ΔG para el movimiento de un soluto hacia fuera de la célula, el término para las proporciones de concentración se cambia a $[C_o]/[C_i]$.)

Si el soluto es un electrólito (una especie con carga), también debe considerarse la diferencia de carga general entre los dos compartimientos. Como resultado de la repulsión mutua de

iones con cargas similares, el paso de un electrólito a través de la membrana de un compartimiento a otro con una carga neta del mismo signo es un cambio no favorecido, desde el punto de vista termodinámico. Por el contrario, si la carga del electrólito es de signo contrario al que tiene el compartimiento hacia el cual se dirige, el proceso se favorece en sentido termodinámico. Mientras mayor sea la diferencia en la carga (diferencia potencial o voltaje) entre ambos compartimientos, mayor es la diferencia en la energía libre. Por lo tanto, la tendencia de un electrólito para difundir entre dos compartimientos depende de dos gradientes: un gradiente químico determinado por la diferencia de la concentración entre los dos compartimientos y un gradiente de potencial eléctrico, determinado por la diferencia en la carga. Juntas, estas diferencias se combinan para formar un **gradiente electroquímico**. El cambio de energía libre para la difusión de un electrólito hacia el interior de la célula es

$$\Delta G = RT \ln \frac{[C_i]}{[C_o]} + zF\Delta E_m$$

donde z es la carga del soluto, F la constante de Faraday (23.06 kcal/V · equivalente, donde un equivalente es la cantidad del electrólito que tiene un mol de carga) y ΔE_m la diferencia de potencial (en voltios) entre los dos compartimientos. En el ejemplo previo se vio que una diferencia de 10 veces en la concentración de un no electrólito a través de una membrana a 25°C genera una ΔG de −1.4 kcal/mol. Supóngase que el gradiente de concentración consistiera en iones de sodio (Na^+), que tienen una concentración 10 veces mayor fuera de la célula que en el citoplasma. Como el voltaje a través de la membrana de una célula casi siempre es cercano a −70 mV (pág. 164), el cambio de energía libre para el movimiento de un mol de iones Na^+ hacia el interior de la célula en estas condiciones sería:

$$\Delta G = -1.4 \text{ kcal/mol} + zF\Delta E_m$$
$$\Delta G = -1.4 \text{ kcal/mol} + (1)(23.06 \text{ kcal/V} \cdot \text{mol})(-0.07 \text{ V})$$
$$= -3.1 \text{ kcal/mol}$$

En consecuencia, en las condiciones descritas, la diferencia de concentración y el potencial eléctrico hacen contribuciones similares al almacenamiento de energía libre a través de la membrana.

La interrelación entre las diferencias de concentración y potencial se ve en la difusión de los iones de potasio (K^+) hacia el exterior de la célula. La salida de este ion se ve favorecida por el gradiente de concentración de K^+, ya que la concentración de K^+ es más alta dentro de la célula, pero está amortiguada por el gradiente eléctrico que su difusión crea, la cual deja una carga negativa mayor dentro de la célula. Este tema se trata con más detalle cuando se considera el tema de potenciales de membrana e impulsos nerviosos en la sección 4.8.

Difusión de sustancias a través de las membranas

Antes que un no electrólito se difunda en forma pasiva a través de una membrana plasmática deben cumplirse dos condiciones. La sustancia debe estar presente en mayor concentración en un lado de la membrana que en el otro y la membrana debe ser permeable a la sustancia. Una membrana puede ser permeable a determinado soluto: a) porque ese soluto puede pasar en forma directa por la bicapa de lípidos o b) porque ese soluto puede atravesar un poro acuoso que cruza la membrana e impide que el soluto entre en contacto con las moléculas lipídicas de la bicapa. Para empezar, considérese la primera vía en la que una sustancia debe disolverse en la bicapa de lípidos para pasar por la membrana.

La descripción de la difusión simple lleva a considerar la polaridad de un soluto. Una medida simple de polaridad (o no polaridad) de una sustancia es su **coeficiente de partición**, que es la proporción entre su solubilidad en un solvente no polar, como octanol o un aceite vegetal, y la solubilidad en agua en condiciones en las que el solvente no polar y el agua se mezclen. La figura 4-33 muestra la relación entre el coeficiente de partición y la permeabilidad de la membrana de diversas sustancias y fármacos. Resulta evidente que mientras mayor sea la solubilidad en lípidos es más rápida la penetración.

Otro factor que determina la velocidad de penetración de un compuesto a través de la membrana es su tamaño. Si dos moléculas tienen coeficientes de partición similares, la molécula más pequeña tiende a penetrar la bicapa de lípidos de una membrana con más rapidez que la molécula más grande. Las moléculas muy pequeñas sin carga penetran con gran rapidez

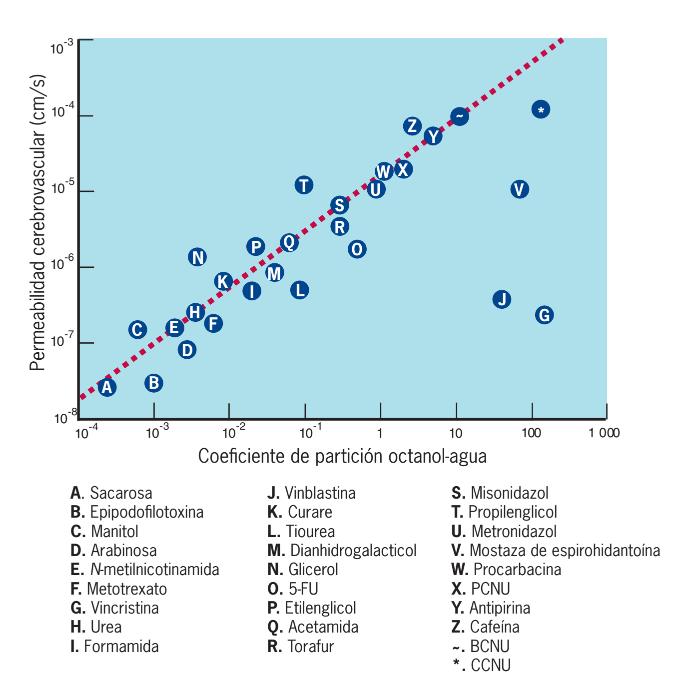


FIGURA 4-33 Relación entre el coeficiente de partición y la permeabilidad de la membrana. En este caso se midió la penetración de diversas sustancias y fármacos a través de las membranas plasmáticas de las células que recubren los capilares cerebrales. Las sustancias penetran porque pasan a través de la bicapa lipídica de estas células. El coeficiente de partición se expresa como el índice entre la solubilidad de un soluto en octanol y su solubilidad en agua. La permeabilidad se expresa como la penetrancia (P) en cm/seg. Para todos los compuestos, excepto unos cuantos como la vinblastina y la vincristina, la penetración es directamente proporcional a la solubilidad en lípidos. (Tomada de N. J. Abbott e I. A. Romero, Molec Med Today 2:110, 1996; © 1996, con autorización de Elsevier Science.)

las membranas celulares. Por consiguiente, las membranas son muy permeables a las moléculas inorgánicas pequeñas, como O_2, CO_2, NO y H_2O, que se considera que pasan entre los fosfolípidos adyacentes. A diferencia de las moléculas polares más grandes, como los azúcares, aminoácidos e intermediarios fosforilados, poseen poca penetrabilidad en la membrana. Como resultado, la bicapa lipídica de la membrana plasmática constituye una barrera efectiva que impide la difusión de estos metabolitos esenciales hacia el exterior. Algunas de estas moléculas (p. ej., azúcares y aminoácidos) deben entrar a las células a partir de la corriente sanguínea, pero no pueden hacerlo por difusión simple. En lugar de eso, debe haber mecanismos especiales disponibles que permitan su penetración a través de la membrana plasmática. El uso de éstos permite que la célula regule el movimiento de sustancias a través de su barrera superficial. Más adelante se regresará a esta característica.

La difusión del agua a través de las membranas Las moléculas de agua se mueven con mucha más rapidez a través de la membrana celular que los iones disueltos o los pequeños solutos orgánicos polares, que son incapaces de penetrar. A causa de esta diferencia en la penetrabilidad del agua en comparación con los solutos, se dice que las membranas son **semipermeables**. El agua se mueve con facilidad a través de una membrana semipermeable de una región con menor concentración de *solutos* a una región con mayor concentración de *solutos*. Este proceso se llama **ósmosis** y es fácil de demostrar si se coloca una célula en una solución que contenga un soluto no penetrante con una concentración diferente a la presente dentro de la célula.

Cuando se separan dos compartimientos con diferente concentración de solutos mediante una membrana semipermeable, se dice que el compartimiento con mayor concentración de solutos es **hipertónico** (o **hiperosmótico**) en relación con el comportamiento que tiene la menor concentración de soluto, que se describe como **hipotónico** (o **hipoosmótico**). Cuando se coloca una célula en una solución hipotónica, muy pronto la célula capta agua por ósmosis y se hincha (fig. 4-34*a*). Por el contrario, una célula que se coloca en una solución hipotónica pierde agua por ósmosis y se encoge (fig. 4-34*b*). Estas simples observaciones muestran que el volumen de una célula está controlado por la diferencia entre la concentración de soluto dentro de la célula y la concentración en el medio extracelular. Por lo general, la hinchazón y el encogimiento de las células en medios un poco hipotónicos e hipertónicos son fenómenos temporales. Después de unos cuantos minutos, las células se recuperan y regresan a su volumen original. En un medio hipotónico, la recuperación se produce conforme las células pierden iones, lo que reduce su presión osmótica interna. En un medio hipertónico, la recuperación se logra cuando la célula obtiene iones del medio. Una vez que la concentración interna de solutos (que incluye una alta concentración de proteínas disueltas) iguala a la concentración externa de solutos, los líquidos interno y externo son **isotónicos** (o **isoosmóticos**) y ya no se produce desplazamiento de agua hacia dentro o fuera de la célula (fig. 4-34*c*).

La ósmosis es un factor importante en muchas funciones corporales. Por ejemplo, el tubo digestivo secreta varios litros de jugo al día y las células que recubren el intestino lo resorben por ósmosis. Si este líquido no se reabsorbiera, como sucede en el caso de la diarrea extrema, la persona enfrentaría la posibilidad de deshidratación rápida. Las plantas recurren a la ósmosis de distintas maneras. A diferencia de las células animales que casi siempre son isotónicas respecto del medio en el que se encuentran inmersas, las células vegetales casi siempre son hipertónicas en comparación con su ambiente líquido. Como resultado, existe una tendencia a que el agua ingrese a la célula, lo que ocasiona una presión interna (*turgencia*) que empuja contra la

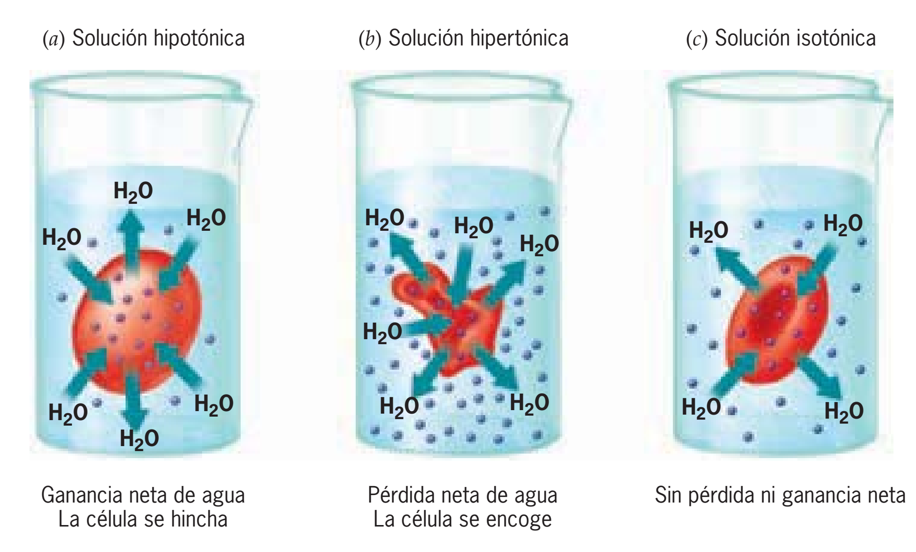


FIGURA 4-34 Efectos de las diferencias de la concentración de solutos en los lados contrarios de la membrana plasmática. *a*) Una célula colocada en una solución hipotónica (con menor concentración de soluto que la célula) se hincha por la ganancia neta de agua mediante ósmosis. *b*) Una célula en una solución hipertónica se encoge por la pérdida neta de agua mediante ósmosis. *c*) Una célula colocada en una solución isotónica mantiene un volumen constante porque la entrada y salida de agua son iguales.

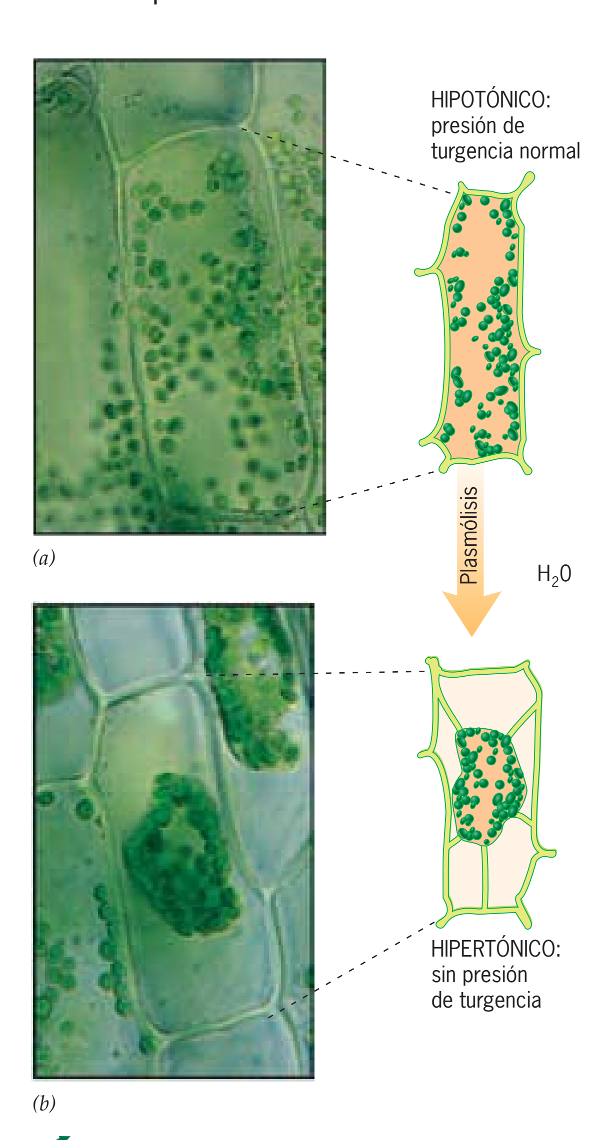


FIGURA 4-35 Efectos de la ósmosis en una célula vegetal. *a*) Las plantas acuáticas que viven en agua dulce están rodeadas por un ambiente hipotónico. Por lo tanto, el agua tiende a entrar a las células, lo que crea la presión por turgencia. *b*) Si la planta se coloca en una solución hipertónica, como el agua marina, la célula pierde agua y la membrana plasmática se aleja de la pared celular. (© Ed Reschke.)

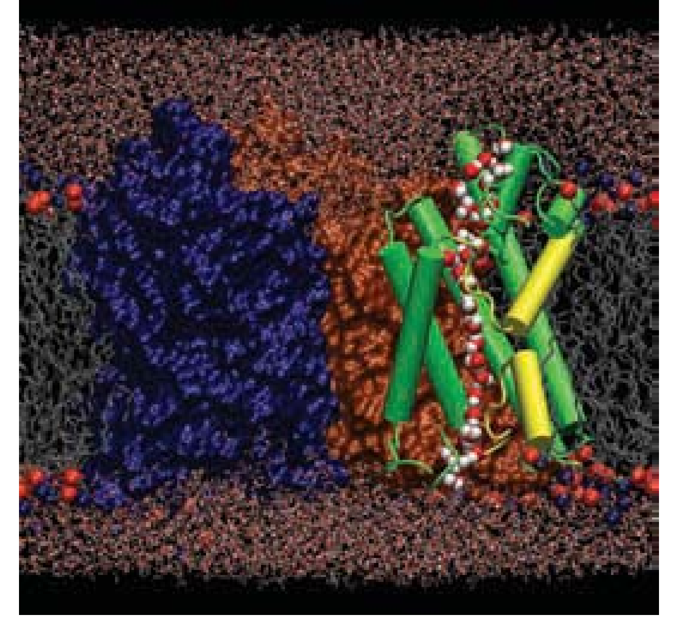
pared circundante (fig. 4-35*a*). La presión de la turgencia suministra soporte a las plantas no leñosas y las partes no leñosas de las plantas, como las hojas. Si una célula vegetal se coloca en un medio hipertónico, su volumen se reduce conforme la membrana plasmática se separa de la pared celular que la rodea, un proceso conocido como **plasmólisis** (fig. 4-35*b*). La pérdida de agua debida a la plasmólisis hace que las plantas pierdan su soporte y se marchiten.

Muchas células son mucho más permeables al agua de lo que puede explicarse por la difusión simple a través de la bicapa de lípidos. A principios del decenio de 1990, Peter Agre y colaboradores de la *Johns Hopkins University* intentaban aislar y purificar las proteínas de membrana que constituyen el antígeno Rh presente en la superficie de los eritrocitos. Durante esta tarea identificaron una proteína la cual pensaron que podría ser el largamente buscado canal de agua de la membrana eritrocítica. Para probar su hipótesis, modificaron mediante ingeniería genética oocitos de rana para incorporar la proteína recién descubierta en sus membranas plasmáticas y luego colocaron los oocitos en un medio hipotónico. Exactamente como habían predicho, los oocitos se hincharon debido al ingreso de agua y al final estallaron. Los investigadores habían descubierto una familia de pequeñas proteínas integrales, llamadas *acuaporinas*, que permiten el movimiento pasivo de agua de un lado de la membrana plasmática al otro. Cada subunidad de acuaporina (en la proteína de cuatro subunidades) contiene un canal central que está recubierto principalmente con aminoácidos hidrófobos y es altamente específico para las moléculas de agua. Alrededor de mil millones de moléculas de agua, en una sola fila, pueden pasar por cada canal cada segundo. Al mismo tiempo, los iones H^+, que por lo general saltan a lo largo de una cadena de moléculas de agua, no pueden penetrar estos poros abiertos. El posible mecanismo por el cual estos canales son capaces de excluir protones ha sido sugerido por una combinación de estudios cristalográficos por rayos X, que han revelado la estructura de la proteína, y simulaciones por computadora (pág. 60), que pusieron a funcionar esta estructura proteínica. En la figura 4.36*a* se presenta un modelo basado en estas simulaciones. Muy cerca de su punto más estrecho, la pared de un canal de acuaporina contiene un par de cargas positivas situadas de manera muy precisa (residuos N203 y N68 en la figura 4.36*b*) que atraen el átomo de oxígeno de cada molécula de agua conforme ésta se acelera para pasar por la constricción de la proteína. Esta interacción orienta la molécula de agua central en una posición que impide que mantenga los enlaces de hidrógeno que normalmente la unen a las moléculas de agua adyacentes. Esto elimina el puente que en circunstancias normales permitiría a los protones moverse de una molécula de agua a la siguiente.

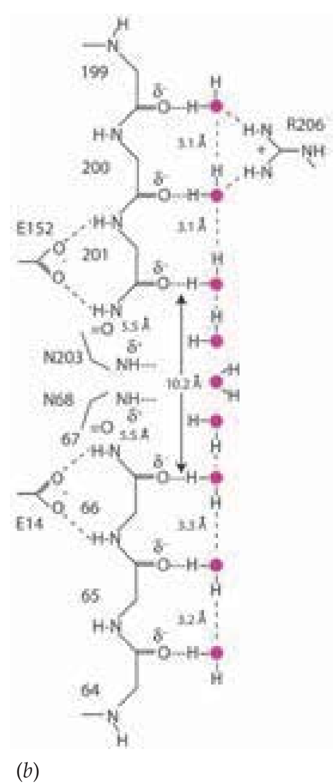
Las acuaporinas son muy abundantes en células, como las de los túbulos renales o las raíces de las plantas, en las que el paso de agua tiene un papel crucial en las actividades fisiológicas de los tejidos. La hormona vasopresina, que estimula la retención de agua en los túbulos colectores del riñón, actúa a través de una de estas proteínas (AQP2). En algunos casos del trastorno hereditario *diabetes insípida nefrógena congénita* se ha rastreado el defecto hasta una mutación en este canal de acuaporina. Las personas que sufren esta enfermedad eliminan enormes cantidades de orina porque sus riñones no responden a la vasopresina.

La difusión de iones a través de las membranas La bicapa de lípidos que constituye el centro de las membranas biológicas es impermeable a las sustancias con carga eléctrica, incluidos iones pequeños como Na^+, K^+, Ca^{2+} y Cl^-. Aun así, el movimiento (**conductancia**) de estos iones a través de las membranas tiene una función esencial en múltiples actividades celulares, incluidas la formación y propagación de un impulso nervioso, secreción de sustancias hacia el espacio celular, contracción muscular, regulación del volumen celular y la abertura de estomas en las hojas de las plantas.

En 1955, Alan Hodgkin y Richard Keynes de la *Cambridge University* propusieron por primera vez que las membranas celulares contenían **canales iónicos**, es decir, aberturas en la membrana que son permeables a iones específicos. A finales del decenio de 1960 y en el de 1970, Bertil Hille de la *University of Washington* y Clay Armstrong de la *University of Pennsylvania*



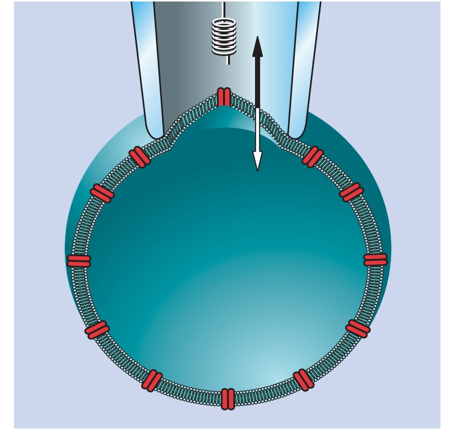
(*a*)



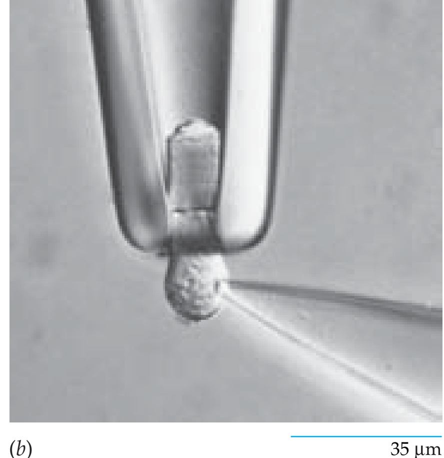
(*b*)

FIGURA 4-36 Paso de moléculas de agua a través de un canal de acuaporina. *a*) Instantánea de una simulación dinámica molecular de una corriente de moléculas de agua (esferas rojo y blanco) que pasan en una sola fila por un canal en una de las subunidades de una molécula de acuaporina que residen dentro de la membrana. *b*) Modelo que describe el mecanismo por el cual las moléculas de agua pasan por un canal de acuaporina con la exclusión simultánea de protones. Se muestran nueve moléculas de agua alineadas en una sola fila a lo largo de la pared del canal. Cada molécula de agua se ilustra como un átomo de oxígeno (O) circular rojo con dos hidrógenos (H) unidos a él. En este modelo, las cuatro moléculas de agua de las partes superior e inferior del canal están orientadas, como resultado de su interacción con los grupos carbonilo (C═O) del esqueleto de proteína (pág. 51), con sus átomos de hidrógeno dirigidos en sentido opuesto al centro del canal. Estas moléculas de agua son capaces de formar puentes de hidrógeno (líneas discontinuas) con sus vecinas. En cambio, la molécula de agua individual en el centro del canal está en una posición que le impide formar enlaces de hidrógeno con otras moléculas de agua, lo cual tiene el efecto de interrrumpir el flujo de protones por el canal. Puede verse una animación de los canales de acuaporina en www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2003/animations.html. (*A*, Reimpresa de Benoit Roux and Klaus Schulten, Structure 12:1344, 2004, con autorización de Cell Press; *B*, Reimpresa de R. M. Stroud, et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 13:428, 2003. Copyright 2003, con autorización de Elsevier Science.)

empezaron a obtener evidencia de la existencia de estos canales. La “prueba” final surgió del trabajo de Bert Sakmann y Erwin Neher del *Instituto Max Planck*, de Alemania a finales del decenio de 1970 y en el de 1980 desarrollaron técnicas para vigilar la corriente iónica que pasa por un solo canal iónico. Lo lograron con micropipetas muy finas con electrodos hechas de vidrio pulido que se colocan en la superficie externa de la célula y sellan la membrana por succión. Así puede mantenerse el voltaje a través de la membrana (*fijarse*) en cualquier valor particular y se puede medir la corriente que se origina en el pequeño parche de



(*a*)



(*b*) 35 μm

FIGURA 4-37 Medición de la conductancia de un canal iónico mediante registro con pinza de parche. *a*) En esta técnica, una micropipeta de vidrio bien pulida se coloca contra una porción de la superficie externa de la célula y se aplica aspiración para sellar el borde de la pipeta contra la membrana plasmática. Dado que la pipeta está equipada con un electrodo (un *microelectrodo*), puede suministrarse un voltaje a través del parche de membrana encerrado por la pipeta y es posible medir la respuesta del flujo de iones a través de los canales de la membrana. Como se indica en la figura, la micropipeta puede rodear un parche de membrana que contenga un solo canal iónico, lo que permite a los investigadores vigilar la abertura y cierre de un solo canal con compuerta, además de medir su conductancia con la aplicación de diferentes voltajes. *b*) La micrografía evidencia los registros con pinza de parche que se tomaron de una sola célula fotorreceptora de la retina de una salamandra. Una porción de la célula entra a la micropipeta de vidrio por la aspiración, mientras una segunda micropipeta con electrodo (abajo a la derecha) se sella contra un pequeño parche de membrana plasmática en otra parte de la célula. (*B*, tomada de T. D. Lamb, H. R. Matthews y V. Torre, J Physiol 372:319, 1986; reproducida con autorización.)

membrana rodeado por la pipeta (fig. 4-37). Estos estudios fundamentales marcaron las primeras investigaciones exitosas de las actividades de las moléculas individuales de proteína. Ahora, los biólogos ya identificaron una variedad asombrosa de canales iónicos, cada uno formado por proteínas integrales de membrana que rodean un poro acuoso central. Como podría haberse predicho, las mutaciones en los genes que codifican canales iónicos tienen la capacidad de causar muchas enfermedades graves (véase el cuadro 1 de la sección Perspectiva humana, pág. 160).

Casi todos los canales iónicos son muy selectivos y sólo permiten el paso de un tipo particular de iones por el poro. Como sucede con la difusión pasiva de otros tipos de solutos a través de las membranas, la difusión de iones a través de un canal siempre es "colina abajo", es decir, de un estado de mayor energía a un estado de menor. La mayoría de los canales iónicos que se han identificado puede encontrarse en su conformación abierta o cerrada; se dice que estos canales son controlados por una especie de compuerta (o simplemente **controlados**). La abertura y cierre de puertas están sujetos a la regulación fisiológica compleja y pueden inducirse con diversos factores, según sea el canal particular. Las dos categorías principales de los canales con puerta son las siguientes:

1. **Canales abiertos por voltaje**, cuya conformación depende de la diferencia de la carga iónica a los dos lados de la membrana.
2. **Canales abiertos por ligando**, cuya conformación depende de la unión con una molécula específica (el ligando), que casi nunca es el soluto que pasa por el canal. Algunos canales abiertos por ligando se abren (o cierran) después de la unión de una molécula con la superficie externa del canal; otros se abren (o cierran) después de la unión de un ligando con la superficie interna del canal. Por ejemplo, los neurotransmisores como la acetilcolina actúan en la superficie externa de ciertos canales catiónicos, mientras que ciertos nucleótidos, como el cAMP, actúan sobre la superficie interna de ciertos canales iónicos para calcio.
3. **Canales controlados mecánicamente**, cuyo estado conformacional depende de fuerzas mecánicas (p. ej., tensión por estiramiento) que se aplican a la membrana. Por ejemplo, los miembros de una familia de canales catiónicos son abiertos por los movimientos de estereocilios (véase fig. 9-54) en las células pilosas del oído interno en respuesta a sonido o movimientos de la cabeza.

La descripción siguiente se enfoca en la estructura y función de los canales iónicos de potasio porque son los que mejor se conocen.

En 1998, Roderick MacKinnon y colaboradores de la *Rockefeller University* obtuvieron la primera imagen de resolución atómica de una proteína de canal iónico, en este caso un canal iónico bacteriano para el potasio llamado KcsA. La relación entre estructura y función es evidente en todos los confines del mundo biológico, pero resulta difícil encontrar un mejor ejemplo que el del canal iónico de K^+ que se ilustra en la figura 4-38. Como se verá pronto, la formulación de esta estructura condujo directamente a un entendimiento del mecanismo por el cual estas notables máquinas moleculares son capaces de seleccionar de manera abrumadora iones K^+ sobre iones Na^+, y al mismo tiempo permitir una conductancia increíblemente grande de iones K^+ a través de la membrana. También se observará que los mecanismos de selectividad y conductancia iónica en este canal bacteriano son virtualmente idénticos a los que operan en los canales de mamífero, mucho más grandes. Resulta evidente que los desafíos básicos en la operación de un canal iónico se resolvieron relativamente temprano en la evolución,

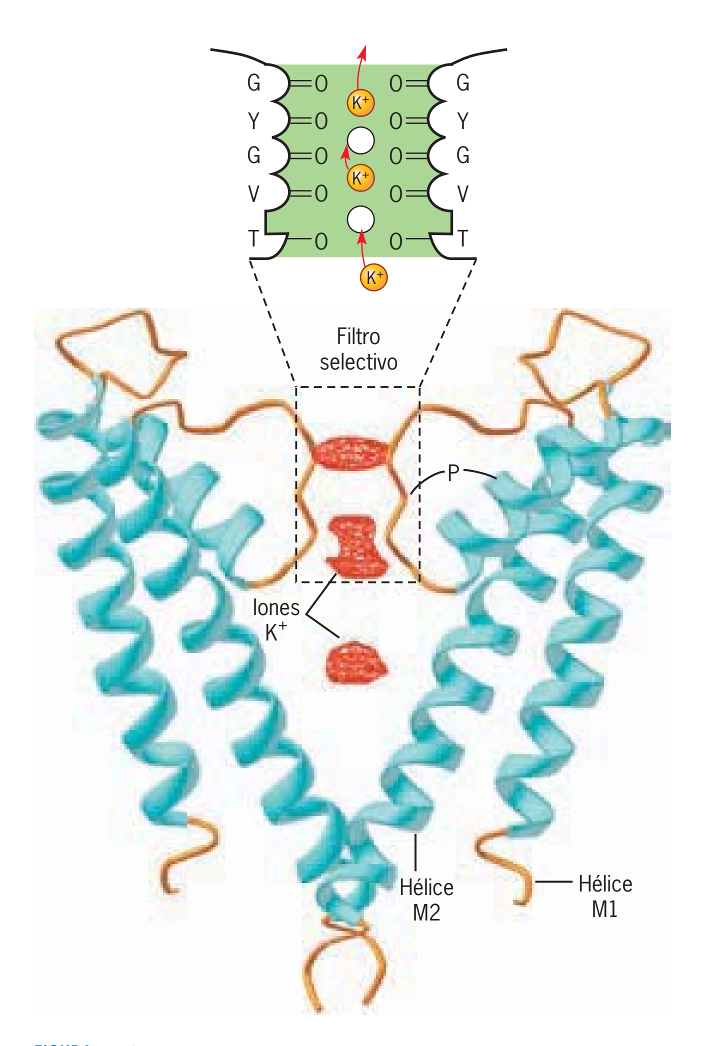


FIGURA 4-38 Estructura tridimensional del canal bacteriano KcsA y la selección de iones K^+. Este canal iónico para el K^+ posee cuatro subunidades, dos de las cuales se muestran aquí. Cada subunidad se compone de hélices M1 y M2 unidas por un segmento P (poro) que consiste en una hélice corta y una porción no helicoidal que recubre el canal a través del cual pasan los iones. Una porción de cada segmento P contiene un pentapéptido conservado (GYGVT), cuyos residuos recubren el filtro de selectividad que elige los iones K^+. Los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo de estos residuos se proyectan en el canal, donde pueden interactuar en forma selectiva con los iones K^+ (indicados por las mallas rojas) dentro del filtro. Como se indica en el inserto superior, el filtro de selectividad contiene cuatro anillos de átomos O carbonilo y un anillo de átomos O treonilo; cada uno de estos cinco anillos posee cuatro átomos O, uno donado por cada subunidad. El diámetro de los anillos es apenas lo bastante grande para que los ocho átomos O puedan coordinar un solo ion K^+ y repongan su agua normal de hidratación. Aunque se muestran cuatro sitios de unión para K^+, sólo dos se ocupan cada vez. (Tomada de Roderick MacKinnon, reimpresa con autorización de Nature Med 5:1108, 1999; © 1999, Macmillan Magazines Limited.)

aunque muchas depuraciones aparecieron en los mil o dos mil millones de años siguientes.

El canal KcsA consiste en cuatro subunidades, dos de las cuales se muestran en la figura 4-38. Se puede ver que cada subunidad de la figura contiene dos hélices que cruzan la membrana (M1 y M2) y una región poro (P) en el extremo extracelular del canal. P incluye una hélice poro corta que abarca cerca de un tercio del grosor del canal y un asa no helicoidal (en café claro en la figura 4-38) que forma el recubrimiento de un *filtro de selectividad* estrecho, llamado así por su papel para permitir sólo el paso de iones K^+.

El recubrimiento del filtro de selectividad contiene un pentapéptido bien conservado: Gli-Tir-Gli-Val-Tre (o GYGVT en la nomenclatura de una sola letra). La estructura cristalográfica con rayos X del canal KcsA muestra que la columna vertebral de grupos carbonilo (C═O) del pentapéptido conservado (véase la estructura de la columna en la página 51) forma el recubrimiento del filtro de selectividad. Los residuos conservados del filtro de selectividad crean cinco anillos sucesivos de átomos de oxígeno (cuatro anillos están formados por oxígenos carbonilo de la columna de polipéptido y un anillo consiste en átomos de oxígeno de la cadena lateral de la treonina). Cada anillo contiene cuatro átomos de oxígeno (uno de cada subunidad) y tiene un diámetro aproximado de 3 Å un poco mayor que el diámetro de 2.7 Å del ion K^+ que perdió su cubierta normal de hidratación. Por consiguiente, los átomos de O electronegativos que recubren el filtro de selectividad pueden sustituir la cubierta de moléculas de agua que se desplazan conforme cada ion K^+ entra al poro. En este modelo, el filtro de selectividad contiene cuatro sitios potenciales para unión con iones K^+. Como se indica en la entrada superior de la figura 4-38, un ion K^+ unido en cualquiera de estos cuatro sitios ocuparía el centro de una "caja" que tiene cuatro átomos de O en un plano sobre el ion y cuatro átomos de O en un plano por debajo del átomo. Como resultado, cada ion K^+ en uno de estos sitios se coordinaría con ocho átomos de O del filtro de selectividad. Aunque el filtro de selectividad tiene un ajuste preciso para un ion K^+ deshidratado, es mucho más grande que el diámetro del ion Na^+ deshidratado (1.9 Å). Por consiguiente, un ion Na^+ no puede interactuar en forma óptima con los ocho átomos de oxígeno necesarios para estabilizarlo en el poro. Como resultado, los iones Na^+ más pequeños no pueden vencer la barrera de mayor energía necesaria para penetrar el poro.

Aunque hay cuatro sitios potenciales para unión con el ion K^+, sólo dos se ocupan en un momento determinado. Se cree que los iones de potasio se mueven, dos a la vez, de los sitios 1 y 3 a los sitios 2 y 4, como se indica en la entrada superior de la figura 4-38. La entrada de un tercer ion K^+ en el filtro de selectividad crea una repulsión electrostática que expulsa el ion unido en el extremo contrario de la línea. Algunos estudios indican que no existe ninguna barrera energética para que un ion se mueva de un sitio de unión al siguiente, lo cual explica el flujo tan rápido de iones a través de la membrana. Cuando se consideran en conjunto, estas conclusiones acerca de la selectividad del ion K^+ y la conductancia proporcionan un ejemplo magnífico de lo mucho que se puede aprender sobre la función biológica mediante la comprensión de la estructura molecular.

El canal KcsA mostrado en la figura 4-38 tiene una puerta, tal como los canales eucariotas. En la figura 4-20 se ilustra la abertura de la puerta del canal KcsA como respuesta a un pH muy bajo. La estructura de KcsA que se muestra en la figura 4-38 que en realidad es la conformación cerrada de la proteína (a pesar del hecho de que muestra la presencia de iones en su canal). Aún no es posible cristalizar el canal KcsA en su conformación abierta, pero se pudo cristalizar un canal del K^+ homólogo de las células procariotas (llamado MthK) en la conformación abierta y se identificó su estructura. La comparación de la estructura abierta de MthK y la estructura cerrada de la proteína homóloga KcsA sugiere que la abertura de estas moléculas se logra mediante cambios en la conformación de los extremos citoplásmicos de las hélices internas (M2). Como se ve en la figura 4-38 y en la parte izquierda de la figura 4-39, en la conformación cerrada las hélices M2 son rectas y están cruzadas unas sobre otras para formar un "haz de hélices" que sella la cara citoplásmica del poro. En el modelo de la figura 4-39, el canal se abre cuando las hélices M2 se flexionan en el punto de bisagra específico en el que se localiza el residuo de glicina.

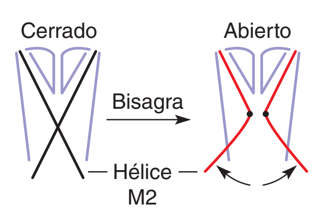


FIGURA 4-39 Ilustración esquemática del modelo de flexión por bisagra de la abertura del canal bacteriano KcsA. Las hélices M2 de cada subunidad se flexionan hacia fuera en un residuo de glicina específico, el cual abre el extremo intracelular del canal a los iones K^+. (Tomada de B. L. Kelly y A. Gross, reimpresa con autorización de Nature Struct Biol 10:280, 2003. © 2003, Macmillan Magazines Limited.)

Ahora que se vio cómo operan estos canales procariotas para el K^+, es más fácil comprender la estructura y función de las versiones eucariotas más complejas, que se cree son similares. Ya se aislaron los genes que codifican distintos canales para el K^+ activados por voltaje (o Kv) y se estudió la anatomía molecular de sus proteínas. Los canales Kv de las plantas tienen un cometido importante en el balance de sal y agua y en la regulación del volumen celular. Los canales Kv de los animales son mejor conocidos por su cometido en el funcionamiento de músculos y nervios, que se explora al final del capítulo. Los canales Kv de los eucariotas contienen seis hélices relacionadas con la membrana, llamadas S1-S6, que se muestran en dos dimensiones en la figura 4-40. Estas seis hélices pueden agruparse en dos dominios funcionalmente distintos:

1. Un ***dominio de poro*** que posee la misma configuración básica que la del canal bacteriano completo ilustrado en la figura 4-38 y contiene el filtro de selectividad que promueve el paso de los iones K^+. Las hélices M1 y M2 y el segmento P del canal KcsA de la figura 4-38 son homólogos de las hélices S5 y S6 y el segmento P de los canales eucariotas abiertos por voltaje ilustrados en la figura 4-40. Al igual que las hélices M2 de KcsA, las hélices S6 recubren gran parte del poro y su configuración determina si la puerta del canal está abierta o cerrada.

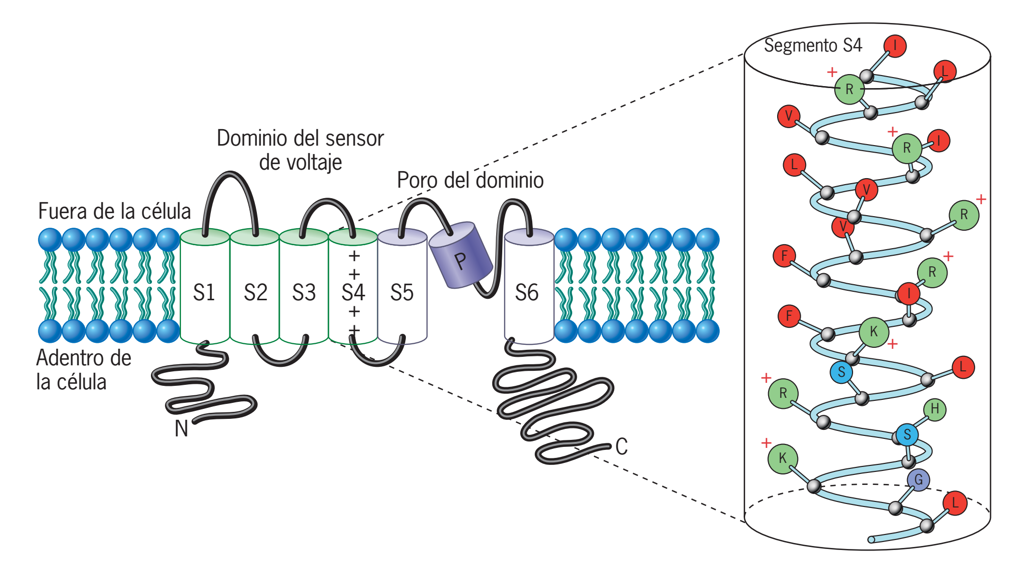


FIGURA 4-40 Estructura del canal de K$^+$ activado por voltaje de células eucariotas. Imagen bidimensional de una subunidad del canal de K$^+$ que muestra sus seis hélices relacionadas con la membrana y una porción del polipéptido (llamado hélice del poro o P) que entra a la proteína para formar parte de la pared del canal. El detalle ilustra la secuencia de aminoácidos de la hélice S4 del canal iónico K$^+$ *sacudidor* de *Drosophila* sp., que contiene siete cadenas laterales con carga positiva que sirven al parecer como sensor de voltaje. Las cadenas laterales con carga positiva se sitúan en cada tercer residuo a lo largo de la hélice, por lo demás hidrófoba. Este miembro de la familia Kv se llama canal *sacudidor* porque las moscas con ciertas mutaciones en la proteína se sacuden con vigor cuando se anestesian con éter. El canal *sacudidor* fue el primer canal del K$^+$ identificado y clonado en 1987.

2. Un ***dominio sensor de voltaje*** que consiste en las hélices S1-S4 que perciben el voltaje a través de la membrana plasmática (como se describe más adelante).

En la figura 4-41 se presenta la estructura cristalina tridimensional de un canal Kv eucariota completo purificado de cerebro de rata. La determinación de esta estructura fue hecha posible por el uso de una mezcla de detergente y lípido durante todo el proceso de purificación y cristalización. Como el canal KcsA, un solo canal Kv eucariota consta de cuatro subunidades homólogas dispuestas en forma simétrica alrededor del poro central que conduce iones. El filtro de selectividad, y por tanto el mecanismo supuesto de selección de iones K$^+$, es virtualmente idéntico en las proteínas KcsA procariotas y las Kv eucariotas. La compuerta que conduce a un canal Kv está formada por los extremos internos de las hélices S6 y se cree que se abre y cierra de modo similar a como ocurre en el caso de las hélices M2 del canal bacteriano (que se muestra en la figura 4-39). La proteína ilustrada en la figura 4-41 representa el estado abierto del canal.

La hélice S4, que contiene varios aminoácidos con carga positiva espaciados a lo largo de la cadena polipeptídica (detalle de la figura 4-40), actúa como el elemento clave del sensor de voltaje. En el modelo de la figura 4-41 se observa que el dominio sensor de voltaje está conectado al dominio del poro mediante una hélice de unión corta denotada como S4-S5. En condiciones de reposo, el potencial negativo a través de la membrana (pág. 164) mantiene la compuerta cerrada. Un cambio del potencial a un valor más positivo (una despolarización, pág. 165) ejerce una fuerza eléctrica sobre la hélice S4. Se cree que esta fuerza hace que la hélice S4 transmembranosa se mueva de tal manera que sus residuos con carga positiva cambian de una posición en la que están expuestos al citoplasma a una nueva posición en la que están expuestos al exterior de la célula. La percepción del voltaje es un proceso dinámico cuyo mecanismo no puede dilucidarse mediante una concepción estática de la proteína como la que se muestra en la figura 4-41. De hecho, en la actualidad se debaten varios modelos antagónicos que describen el mecanismo de acción del sensor de voltaje. Cualquier cosa que ocurra, el movimiento de la hélice S4 en respuesta a la despolarización de la membrana inicia una serie de cambios conformacionales dentro de la proteína que abre la compuerta en el extremo citoplásmico del canal.

Una vez abierto el canal, más de diez millones de iones potasio pueden pasar por él cada segundo, que es casi la velocidad que se produciría mediante difusión libre en solución. Debido al gran influjo de iones, la abertura de una cantidad relativamente pequeña de canales de K$^+$ tiene un impacto significativo en las propiedades eléctricas de la membrana. Después de que el canal se abre por unos cuantos milisegundos, el movimiento de iones K$^+$ cesa "de modo automático" por un proceso conocido como desactivación. Para comprender la desactivación del canal hay que considerar una porción adicional de un canal Kv aparte de los dos dominios transmembranosos descritos antes.

Los canales Kv de los eucariotas típicamente contienen una gran estructura citoplásmica cuya composición varía entre los diferentes canales. Como se indica en la figura 4-42*a*, la desactivación del canal se logra mediante el movimiento de un pequeño péptido de desactivación que pende de la porción citoplásmica de la proteína. Se cree que el péptido de desactivación llega a la boca citoplásmica del poro serpenteando a través de una de cuatro "ventanas laterales" indicadas en la figura. Cuando uno

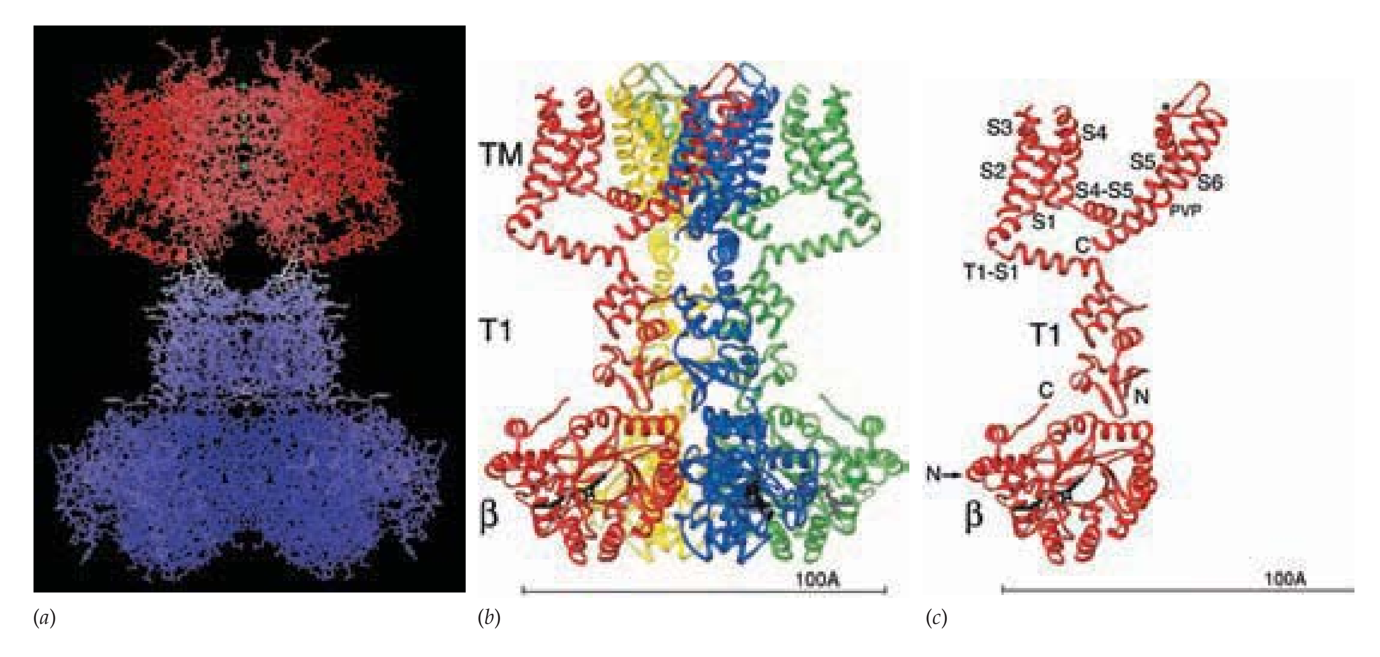


FIGURA 4-41 **Estructura tridimensional de un canal de K^+ activado por voltaje de mamífero.** *a*) Estructura cristalina del canal Kv1.2 tetramérico completo, miembro de la familia Kv (*sacudidor*) de canales iónicos de K^+ presentes en las células nerviosas del encéfalo. La porción transmembranosa se muestra en rojo, y la porción citoplásmica en azul. Los sitios de unión para iones potasio se indican en verde. *b*) Modelo de listón del mismo canal mostrado en *a* con las cuatro subunidades que constituyen el canal en diferentes colores. Si el lector se concentra en la subunidad roja, podrá ver: 1) la separación espacial entre los dominios de detección de voltaje y los dominios de poro de la subunidad y 2) el modo en que los dominios de detección de voltaje de cada unidad están dispuestos sobre el borde externo del dominio de poro de una subunidad vecina. La porción citoplásmica de este canal específico consta de un dominio T1, que es parte del polipéptido mismo del canal, y un polipéptido β separado. *c*) Modelo de listón de una subunidad individual que muestra la orientación espacial de las seis hélices transmembranosas y también la presencia de la hélice de unión S4-S5, que conecta los dominios sensores de voltaje y de poro. Este enlazador transmite la señal del sensor de voltaje S4 que abre el canal. La superficie interna del canal bajo el dominio de poro está recubierta por la hélice S6 (un tanto parecida a la hélice M2 del canal bacteriano que se muestra en la figura 4-38). El canal mostrado aquí se encuentra en la configuración abierta con las hélices S6 curvadas hacia fuera (compare con la figura 4-39) en el sitio marcado PVP (por Pro-Val-Pro, que probablemente es la secuencia de aminoácidos de la "bisagra"). (Reimpresa con permiso de Stephen B. Long, et al., Science 309:867, 899, 2005, cortesía de Roderick MacKinnon; copyright 2005, American Association for the Advancement of Science.)

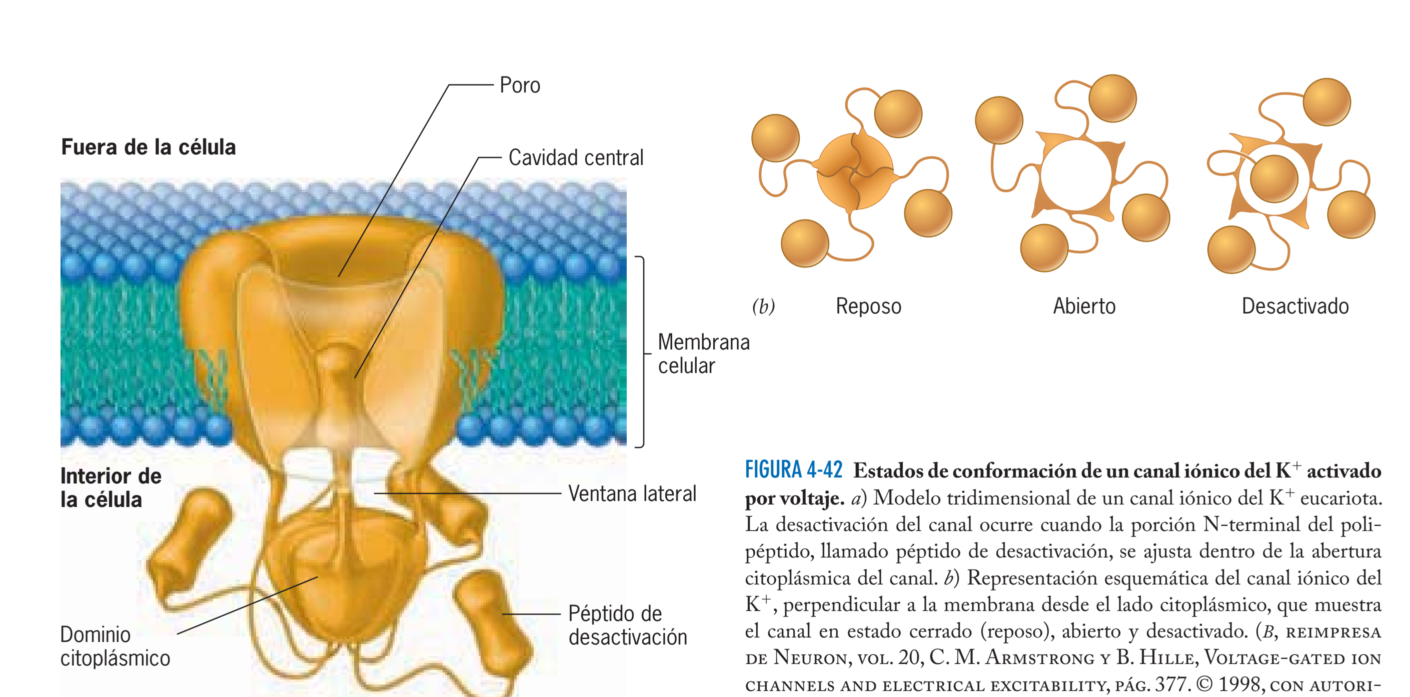


FIGURA 4-42 **Estados de conformación de un canal iónico del K^+ activado por voltaje.** *a*) Modelo tridimensional de un canal iónico del K^+ eucariota. La desactivación del canal ocurre cuando la porción N-terminal del polipéptido, llamado péptido de desactivación, se ajusta dentro de la abertura citoplásmica del canal. *b*) Representación esquemática del canal iónico del K^+, perpendicular a la membrana desde el lado citoplásmico, que muestra el canal en estado cerrado (reposo), abierto y desactivado. (*B*, reimpresa de Neuron, vol. 20, C. M. Armstrong y B. Hille, Voltage-gated ion channels and electrical excitability, pág. 377. © 1998, con autorización de Elsevier Science.)

de estos péptidos colgantes de desactivación se mueve hacia la boca del poro (fig. 4-42*a*), se bloquea el paso de iones y se desactiva el canal. En una etapa posterior del ciclo se libera el péptido de desactivación y la compuerta del canal se cierra. A partir de esta descripción se deduce que el canal del potasio puede encontrarse en tres estados diferentes: abierto, desactivado y cerrado, que se ilustran en la figura 4-42*b*.

Existen diferentes variedades de canales para el potasio. Resulta notable que *C. elegans*, un nematodo cuyo cuerpo consiste sólo en unas 1 000 células, contenga más de 90 genes diferentes que codifican canales de potasio. Resulta evidente la probabilidad de que una sola célula, ya sea de un nematodo, un ser humano o una planta, contenga diversos canales del K^+ diferentes que se abren y cierran como respuesta a distintos voltajes. Además, el voltaje necesario para abrir o cerrar un canal de K^+ particular varía según que la proteína del canal esté fosforilada, lo que a su vez está regulado por hormonas y otros factores. Es evidente que la función del canal iónico está bajo el control de un conjunto diverso y complejo de agentes reguladores. La estructura y la función de un tipo muy diferente de canal iónico, el receptor nicotínico para acetilcolina activado por ligando, es el tema de la sección Vías experimentales al final de este capítulo.

Difusión facilitada

Las sustancias siempre se difunden a través de una membrana de una región de mayor concentración en un lado a una región de menor concentración del lado contrario, pero no siempre se difunden a través de la bicapa lipídica o por un canal. En muchos casos, la sustancia que se difunde se une primero en forma selectiva con una proteína que cruza la membrana llamada **transportador facilitador**, el cual promueve el proceso de difusión. Se piensa que la unión del soluto con el transportador facilitador en un lado de la membrana desencadena un cambio en la conformación de la proteína, lo que expone al soluto a la otra superficie de la membrana, a partir de donde se puede difundir en favor del gradiente de concentración. La figura 4-43 ilustra un ejemplo de este mecanismo. Como operan en forma pasiva, es decir, sin unirse con un sistema que libere energía, los transportadores facilitadores pueden mediar el movimiento de solutos en ambos sentidos con la misma facilidad. La dirección del flujo neto depende de la concentración relativa de la sustancia en ambos lados de la membrana.

La **difusión facilitada**, como se conoce a este proceso, tiene muchas similitudes con una reacción catalizada por una enzima. Al igual que las enzimas, los transportadores facilitadores son específicos para las moléculas que transportan, por ejemplo, discriminan entre los estereoisómeros D y L (pág. 43). Además, tanto las enzimas como los transportadores tienen cinética de tipo saturación (fig. 4-44). A diferencia de los canales iónicos que pueden conducir millones de iones por segundo, la mayoría de los transportadores facilitadores sólo puede mover de cientos a miles de moléculas de soluto por segundo a través de la membrana. Otro rasgo importante de los transportadores facilitadores es que, al igual que las enzimas y los canales iónicos, su actividad puede regularse. La difusión facilitada es muy importante para mediar la entrada y salida de los solutos polares, como los azúcares y aminoácidos, que no penetran la bicapa de lípidos. Esto se ilustra en la sección siguiente.

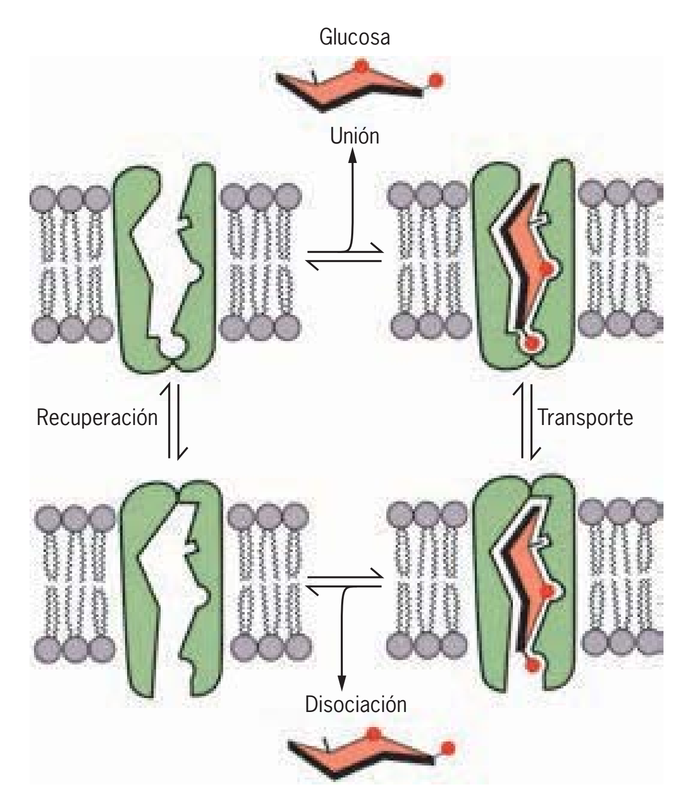


FIGURA 4-43 Difusión facilitada. Modelo esquemático para la difusión facilitada de la glucosa que muestra la conformación alternada de un portador que expone el sitio de unión con glucosa en el interior o exterior de la membrana. (TOMADA DE S. A. BALDWIN Y G. E. LIENHARD, TRENDS BIOCHEM SCI 6:210, 1981.)

El transportador de la glucosa: un ejemplo de difusión facilitada La glucosa es la principal fuente corporal de energía directa y la mayoría de las células de los mamíferos contiene una proteína de membrana que facilita la difusión de la

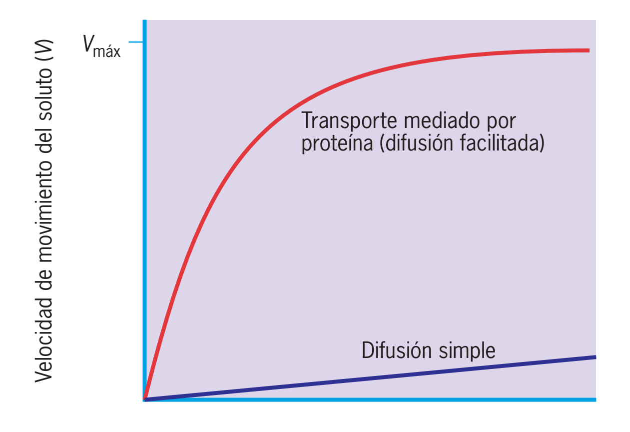


FIGURA 4-44 La cinética de la difusión facilitada comparada con la de la difusión física simple.

glucosa de la sangre a la célula (como se muestra en la figura 4-43). El gradiente que favorece la difusión continua de glucosa hacia la célula se mantiene mediante la fosforilación del azúcar después que entra al citoplasma, lo que disminuye la concentración intracelular de glucosa. Los seres humanos tienen por lo menos cinco proteínas relacionadas (isoformas) que actúan como transportadores facilitadores de glucosa. Estas isoformas, llamadas GLUT1 a GLUT5, se distinguen por los tejidos en los que se localizan, así como por su cinética y características de regulación.

La insulina es una hormona producida por las células endocrinas del páncreas que tiene un papel clave en el mantenimiento de los niveles adecuados de azúcar en la sangre. El aumento de la concentración de glucosa en sangre induce la secreción de insulina, la cual estimula la captación de glucosa en varias células blanco, sobre todo en las células de músculo esquelético y las adiposas (adipocitos). Las células que responden a la insulina comparten una isoforma común del transportador facilitador de glucosa, la GLUT4. Cuando los niveles de insulina son bajos, estas células presentan relativamente pocos transportadores de glucosa en la superficie. En su lugar, los transportadores se encuentran dentro de las membranas de las vesículas citoplásmicas. El incremento de las concentraciones de insulina actúa en las células blanco estimulando la fusión de las vesículas citoplásmicas a la membrana plasmática, lo cual proporciona los transportadores necesarios para llevar glucosa al interior de la célula (véase fig. 15-24).

Transporte activo

La vida no puede existir en condiciones de equilibrio (pág. 93). En ningún sitio esto es más evidente como en el desequilibrio de iones a ambos lados de la membrana plasmática. La concentración típica de K^+ dentro de una célula de mamífero es cercana a 100 mM, mientras que fuera de la célula es sólo de 5 mM. Por consiguiente, existe un intenso gradiente de concentración de K^+ a través de la membrana plasmática que favorece la difusión de K^+ hacia fuera de la célula. Los iones de sodio también se distribuyen de manera muy desigual a ambos lados de la membrana plasmática, pero el gradiente es opuesto, la concentración de Na^+ es cercana a 150 mM fuera de la célula y de 10 mM dentro de ésta. La diferencia de concentración para el calcio es aún mayor; la concentración citosólica típica de 10^{-7} M es 10 000 veces menor que la concentración extracelular. La capacidad de una célula para generar estos gradientes de concentración tan grandes a ambos lados de su membrana plasmática no puede ocurrir por difusión simple o difusión facilitada. Estos gradientes deben generarse mediante **transporte activo**.

Al igual que la difusión facilitada, el transporte activo depende de las proteínas integrales de la membrana que se unen en forma selectiva con un soluto particular y lo mueven a través de la membrana en un proceso impulsado por los cambios en la conformación de la proteína. Sin embargo, a diferencia de la difusión facilitada, el movimiento de un soluto contra un gradiente requiere el ingreso de energía. En consecuencia, el movimiento endergónico de iones u otros solutos a través de la membrana contra un gradiente de concentración se une con un proceso exergónico, como la hidrólisis del ATP, la absorbancia de luz, el transporte de electrones o el flujo de otras sustancias a favor de sus gradientes. Las proteínas que realizan el transporte activo a menudo se conocen como "bombas".

Unión del transporte activo con la hidrólisis de ATP

En 1957, el fisiólogo danés Jens Skou descubrió la enzima que hidroliza el ATP en las células nerviosas de un cangrejo que sólo se activaba en presencia de iones Na^+ y K^+ juntos. Skou propuso, y tenía razón, que esta enzima que produce la hidrólisis del ATP era la misma proteína que realizaba el transporte de ambos iones; la enzima se llamó ATP-asa de Na^+/K^+, o *bomba de sodio-potasio.*

A diferencia del movimiento mediado por proteína de un sistema de difusión facilitada que transporta la sustancia por igual en cualquiera de las dos direcciones, el transporte activo impulsa el movimiento de iones sólo en una dirección. La ATP-asa de Na^+/K^+ es la que produce el gran exceso de iones Na^+ fuera de la célula y el exceso de iones K^+ dentro de ella. Las cargas positivas que tienen estos dos cationes se equilibran con las cargas negativas de varios aniones, de manera que los compartimientos extracelular e intracelular permanecen neutros, desde el punto de vista eléctrico. Los iones cloro tienen mayor concentración fuera de las células, donde equilibran a los iones Na^+ extracelulares. La abundancia de iones K^+ intracelulares se equilibra sobre todo con las cargas negativas excesivas de las proteínas y los ácidos nucleicos.

Muchos estudios mostraron que la proporción entre Na^+/K^+ bombeados por la ATP-asa de Na^+/K^+ no es 1:1, sino 3:2 (véase fig. 4-45). En otras palabras, por cada ATP hidrolizado, se bombean tres iones de sodio hacia el exterior mientras se bombean dos iones de potasio al interior de la célula. A causa de este índice de bombeo, la ATP-asa de Na^+/K^+ es *electrogénica,* lo que significa que contribuye en forma directa a la separación de cargas a través de la membrana. La ATP-asa de Na^+/K^+ es un ejemplo de una bomba iónica de tipo P. La "P" se refiere a la fosforilación, lo que indica que durante el ciclo de bombeo, la hidrólisis del ATP conduce a la transferencia del grupo fosfato liberado a un residuo de ácido aspártico de la proteína de transporte, lo que a su vez induce un cambio en la conformación dentro de la proteína. Los cambios de la conformación son necesarios para modificar la afinidad de la proteína por los dos cationes que transporta. Considérese su actividad. Ésta debe recoger los iones de sodio o potasio de una región de baja concentración, lo cual significa debe tener afinidad relativamente alta por los iones. Luego la proteína debe liberar los iones en el otro lado de la membrana en un ambiente con mucho mayor concentración de cada ion. Para hacerlo, es preciso que disminuya la afinidad de la proteína por ese ion. Por lo tanto, la afinidad por cada ion en los dos lados de la membrana debe ser diferente. Esto se logra con la fosforilación, lo que cambia la forma de la molécula de proteína. El cambio en la forma de la proteína también sirve para exponer los sitios de unión con los iones a los diferentes lados de la membrana, como se explica en el párrafo siguiente.

La figura 4-45 muestra un esquema propuesto del ciclo de bombeo de la ATP-asa de Na^+/K^+. Cuando la proteína se une con tres iones Na^+ en el interior de la célula (paso 1) y se fosforila (paso 2), cambia de la conformación E_1 a la E_2 (paso 3). Al hacerlo, los sitios de unión quedan expuestos al compartimiento extracelular y la proteína pierde su afinidad por los iones

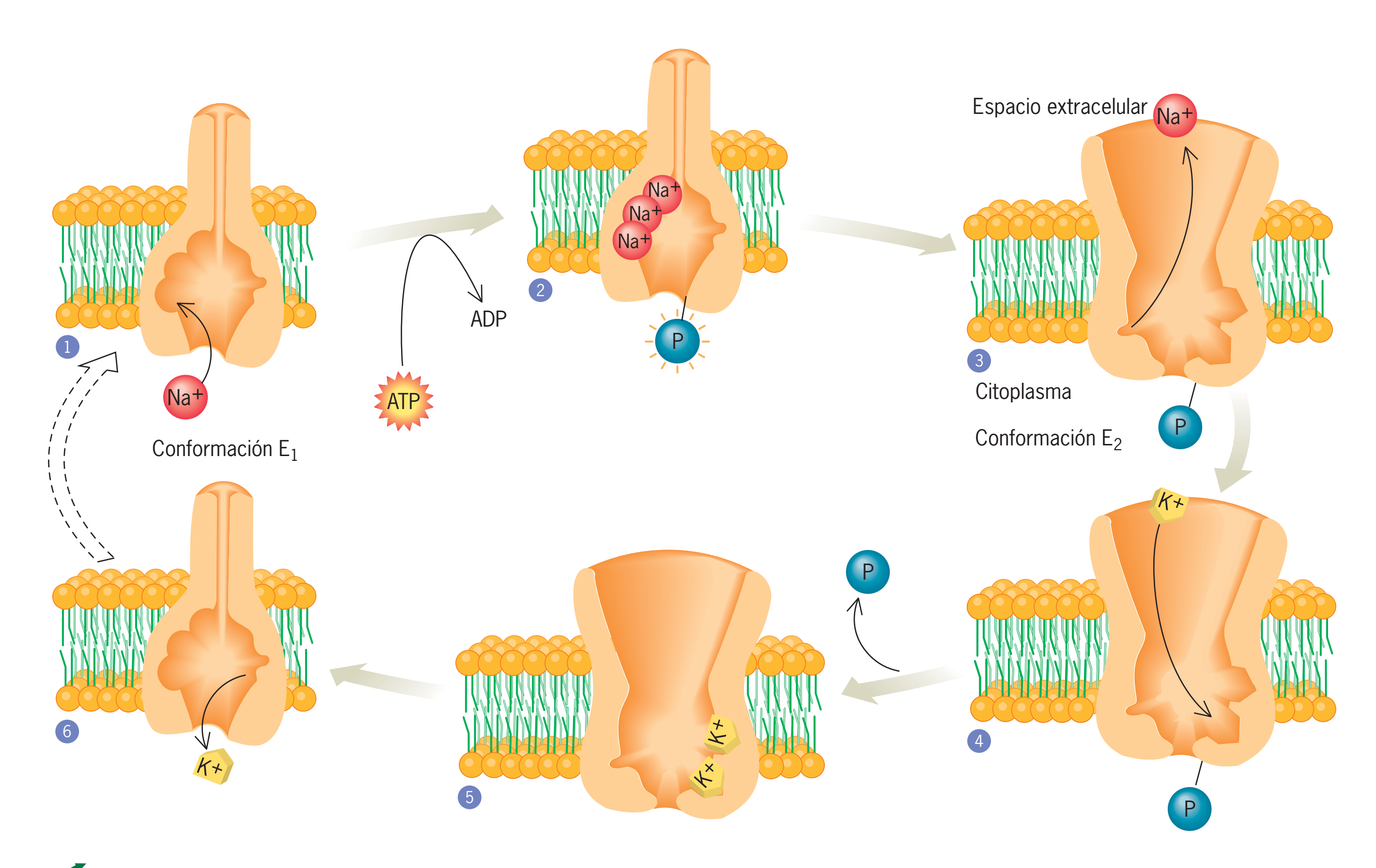


FIGURA 4-45 Modelo esquemático simplificado del ciclo de transporte de la ATP-asa de Na^+/K^+. Los iones de sodio (1) se unen con la proteína en la cara interna de la membrana. El ATP se hidroliza y el fosfato se transfiere a la proteína (2), lo que cambia su conformación (3) y permite que los iones sodio se expulsen hacia el espacio extracelular. Luego, los iones potasio se unen con la proteína (4) y el grupo fosfato se pierde (5), lo cual hace que la proteína regrese a su conformación original y permite que los iones potasio se difundan al interior de la célula (6). Nótese que la ATP-asa de Na^+/K^+ real se compone de dos subunidades diferentes que cruzan la membrana: una subunidad alfa más grande que realiza la actividad transportadora y una subunidad beta más pequeña que participa sobre todo en la maduración y ensamble de la bomba dentro de la membrana. Los sitios de unión de cationes se localizan en el dominio transmembranoso, que consta de diez hélices transmembranosas. (No se incluyeron los pasos en que el ATP se une a la proteína antes de la hidrólisis.) Puede verse una animación del ciclo de bombeo en www.mark-hilge.com/nak/nak-atpase_f.htm

de sodio, los cuales se liberan fuera de la célula. Una vez que se liberan los tres iones de sodio, la proteína recoge dos iones de potasio (paso 4), se desfosforila (paso 5) y regresa a la conformación E_1 original (paso 6). En este estado, el sitio de unión se abre a la superficie interna de la membrana y pierde su afinidad por los iones K^+, lo que permite la liberación de estos iones dentro de la célula. Luego se repite el ciclo.

La importancia de la bomba de sodio-potasio se vuelve evidente cuando se considera que consume alrededor de un tercio de la energía producida por la mayoría de las células animales y dos tercios de la energía producida por las células nerviosas. La digital, un esteroide obtenido de la planta dedalera que se ha utilizado durante 200 años como tratamiento para la insuficiencia cardiaca congestiva, se une con la ATP-asa de Na^+/K^+. La digital fortalece la contracción cardiaca porque inhibe la bomba de Na^+/K^+, lo cual deriva en una cadena de fenómenos que aumentan la disponibilidad de Ca^{2+} dentro de las células musculares del corazón.

Otros sistemas de transporte de iones Los biólogos esperan ansiosamente una estructura de alta resolución de la ATP-asa de Na^+/K^+. Mientras tanto, puede aprenderse mucho sobre las bombas tipo P si se estudia una proteína relacionada, la ATPasa de Ca^{2-}, cuya estructura tridimensional se ha determinado en varias etapas del ciclo de bombeo. La bomba de calcio se encuentra en las membranas del retículo endoplásmico, donde transporta en forma activa los iones de calcio del citosol a la luz de este organelo. El transporte de los iones de calcio por la ATP-asa de Ca^{2+} se acompaña de grandes cambios en la conformación, los cuales se cree que vinculan la hidrólisis del ATP con los cambios en el acceso y afinidad de los sitios de unión con iones.

La bomba de sodio-potasio sólo se encuentra en células animales. Se cree que esta proteína evolucionó en los animales primitivos como el principal mecanismo para mantener el volumen celular y como mecanismo para generar grandes gradientes de Na^+ y K^+ que tienen un papel crucial en el origen

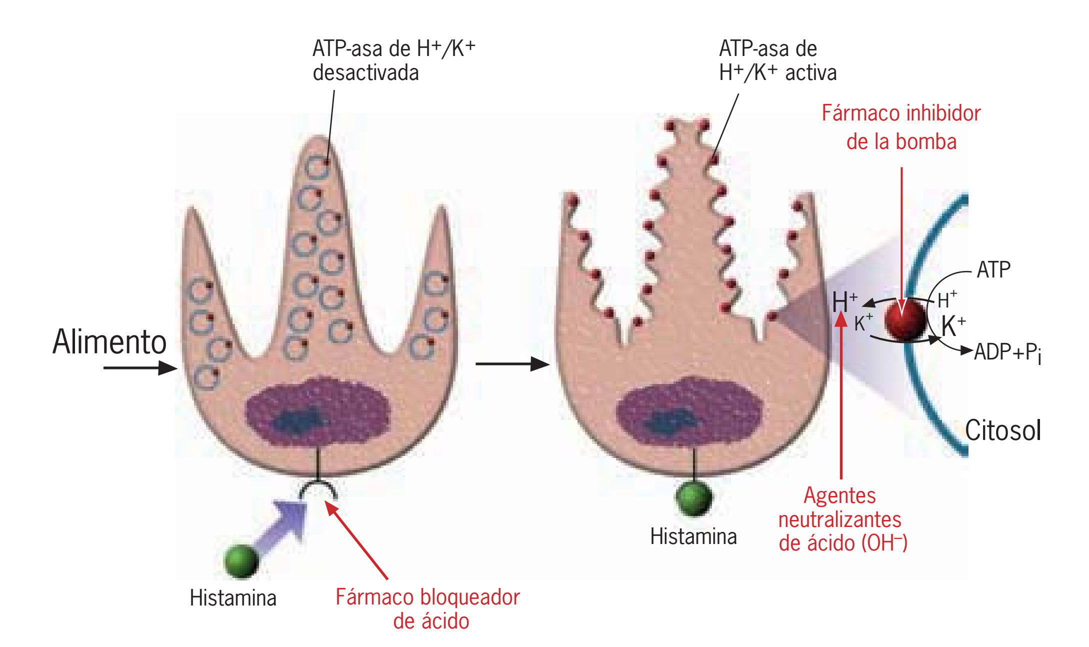


FIGURA 4-46 Control de la secreción de ácido en el estómago. En estado de reposo, las moléculas de ATP-asa de H^+/K^+ están en las paredes de las vesículas citoplásmicas. El alimento que llega al estómago activa una cascada de reacciones estimuladas por hormonas en la pared gástrica que conducen a la liberación de histamina, la cual se une con un receptor en la superficie de las células parietales secretoras de ácido. La unión de la histamina con su receptor estimula una respuesta que deriva en la fusión de las vesículas que contienen la ATP-asa de H^+/K^+ con la membrana plasmática, con lo que se forman pliegues profundos o canalículos. Una vez en la superficie, la proteína de transporte se activa y bombea protones hacia la cavidad gástrica contra un gradiente de concentración (indicado por el tamaño de las letras). El fármaco omeprazol que se utiliza contra la pirosis bloquea la secreción de ácido porque inhibe en forma directa la ATP-asa de H^+/K^+, mientras que varios otros medicamentos antiácidos interfieren con la activación de las células parietales. Los fármacos que neutralizan el ácido proporcionan aniones alcalinos que se combinan con los protones secretados.

de impulsos en las células nerviosas y musculares. Las células vegetales tienen una bomba tipo P que transporta H^+ en la membrana plasmática. En las plantas, esta bomba de protones posee una función clave en el transporte secundario de solutos (descrito más adelante), en el control del pH del citosol y tal vez en el control del crecimiento celular mediante la acidificación de la pared de la célula vegetal.

El recubrimiento epitelial del estómago también contiene una bomba tipo P, la ATP-asa de H^+/K^+, que secreta una solución de ácido concentrado (HCl hasta 0.16 N) hacia la luz gástrica. En estado de reposo, estas moléculas bomba se sitúan en las membranas citoplásmicas de las células parietales del estómago y no son funcionales (fig. 4-46). Cuando el alimento llega al estómago, se transmite un mensaje hormonal a las células parietales que hace que las membranas que contienen las bombas se muevan hacia la superficie apical, donde se fusionan con la membrana plasmática y empiezan a secretar ácido (fig. 4-46). Además de funcionar en la digestión, el ácido gástrico también puede ocasionar pirosis. El omeprazol es un fármaco de uso frecuente que previene la pirosis porque inhibe la ATP-asa de H^+/K^+. Otros medicamentos para la pirosis que bloquean la secreción de ácido (p. ej., antagonistas H_2) no inhiben en forma directa la ATP-asa de H^+/K^+, sino que bloquean un receptor en la superficie de las células parietales, lo que impide que las células se activen con la hormona.

A diferencia de las bombas de tipo P, las de tipo V utilizan la energía del ATP sin formar una proteína fosforilada intermedia. Las bombas tipo V transportan en forma activa iones hidrógeno por las paredes de los organelos citoplásmicos y vacuolas (de ahí su designación, tipo V). Se encuentran en las membranas que recubren los lisosomas gránulos secretores y vacuolas de las células vegetales. Las bombas tipo V también están en las membranas plasmáticas de diversas células. Por ejemplo, una bomba así en las membranas plasmáticas de los túbulos renales ayuda a mantener el equilibrio acidobásico del cuerpo mediante la secreción de protones hacia la orina en formación. Las bombas tipo V tienen una estructura similar a la de la sintasa de ATP que se muestra en la figura 5-23.

Los *transportadores de casete para unión con ATP (ABC)* llamados así porque todos los miembros de esta superfamilia comparten un dominio homólogo para unión con ATP, son otro grupo diverso de proteínas que transporta en forma activa iones. El transportador ABC mejor estudiado se describe en la sección Perspectiva humana.

PERSPECTIVA HUMANA

Defectos en los canales iónicos y transportadores como causa de enfermedad hereditaria

El origen de varias enfermedades hereditarias graves se rastreó hasta mutaciones en los genes que codifican las proteínas de canales iónicos (cuadro 1). La mayoría de los trastornos listados en el cuadro 1 afectan el movimiento de iones a través de las membranas plasmáticas de células excitables (células musculares, nerviosas y sensoriales), lo que reduce la capacidad de estas células para desarrollar o transmitir impulsos (pág. 165). En cambio, la fibrosis quística, el trastorno hereditario de los canales iónicos más frecuente y mejor estudiado, se debe a un defecto en los canales iónicos de las células epiteliales.

En promedio, una de cada 25 personas descendientes de europeos del norte porta una copia del gen mutante que causa fibrosis quística. Como no tienen síntomas del gen mutante, la mayoría de los sujetos heterocigotos no sabe que es portador. Por consiguiente, casi uno de cada 2 500 lactantes de esta población caucásica ($1/25 \times 1/25 \times 1/4$) es recesivo homocigótico para este locus y nace con fibrosis quística (FQ). Aunque la fibrosis quística afecta varios órganos, incluidos el intestino, páncreas, glándulas sudoríparas y aparato reproductor, el sistema respiratorio casi siempre muestra los efectos más graves. Los pacientes con FQ producen moco espeso y pegajoso que es muy difícil de expulsar de las vías respiratorias. Las personas afectadas casi siempre sufren infecciones e inflamación pulmonares crónicas que reducen la función pulmonar en forma progresiva.

El gen causante de la fibrosis quística se aisló en 1989. Una vez que se identificó la secuencia del gen de la FQ y se dedujo la secuencia de aminoácidos del polipéptido correspondiente, resultó aparente que el polipéptido era miembro de la superfamilia de transportadores ABC. La proteína recibió el nombre de *regulador de la conductancia transmembranosa de fibrosis quística* (CFTR), un término ambiguo que reflejaba el hecho de que los investigadores no estaban seguros de su función precisa. La interrogante se resolvió cuando la proteína se purificó, se incorporó en bicapas de lípidos artificiales y se demostró que funcionaba como canal del cloro regulado por AMP cíclico, no como transportador. Sin embargo, estudios realizados después han añadido numerosas complicaciones al cuadro, pues se ha comprobado que el CFTR también: a) conduce iones bicarbonato (HCO_3^-), b) suprime la actividad de un canal iónico epitelial de Na^+ (ENaC) y c) estimula la actividad de una familia de intercambiadores epiteliales de cloruro/bicarbonato. A medida que se ha hecho más compleja la función del CFTR, también se ha hecho más difícil dilucidar cómo es que un defecto en esta proteína ocasiona el desarrollo de infecciones pulmonares crónicas. Si bien existe mucho debate, los investigadores concuerdan con los siguientes enunciados.

1. Como el movimiento del agua hacia fuera de las células epiteliales por ósmosis sigue al movimiento de las sales, las anormalidades en el flujo de Cl^-, HCO_3^-, Na^+ o alguna combinación de ellos a causa de la deficiencia de CFTR podría disminuir el volumen de líquido que baña las células epiteliales de las vías respiratorias. La disminución del volumen del líquido superficial y el aumento consecuente de la viscosidad del moco secretado pueden afectar la función de los cilios que empujan las bacterias fuera de las vías respiratorias.

2. De las bacterias que infectan las vías respiratorias de los pacientes con FQ, *Pseudomonas aeruginosa* es la especie más frecuente y destructiva (fig. 1). Esta bacteria rara vez se encuentra en las vías respiratorias de individuos que sufren otros tipos de enfermedades pulmonares y no se sabe con certeza por qué los pacientes con FQ son tan susceptibles a ella. Los estudios indican que *P. aeruginosa* se une con el extremo extracelular de la proteína CFTR y se conjetura que esta unión puede

Cuadro 1

Trastorno hereditario	Tipo de canal	Gen	Consecuencias clínicas
Migraña hemipléjica familiar (FHM)	Ca^{2+}	*CACNL1A4*	Cefaleas migrañosas
Ataxia episódica tipo 2 (EA-2)	Ca^{2+}	*CACNL1A4*	Ataxia (falta de equilibrio y coordinación)
Parálisis periódica hipopotasiémica	Ca^{2+}	*CACNL1A3*	Miotonía periódica (rigidez muscular) y parálisis
Ataxia episódica tipo 1	K^+	*KCNA1*	Ataxia
Convulsiones neonatales familiares benignas	K^+	*KCNQ2*	Convulsiones epilépticas
Sordera dominante no sindromática	K^+	*KCNQ4*	Sordera
Síndrome de QT largo	K^+	*HERG*	Mareo, muerte súbita por fibrilación ventricular
		KCNQ1, o	
	Na^+	*SCN5A*	
Parálisis periódica hiperpotasiémica	Na^+	*SCN4A*	Miotonía y parálisis periódicas
Síndrome de Liddle	Na^+	B-*ENaC*	Hipertensión (presión sanguínea alta)
Miastenia grave	Na^+	*nAChR*	Debilidad muscular
Enfermedad de Dent	Cl^-	*CLCN5*	Cálculos renales
Miotonía congénita	Cl^-	*CLC-1*	Miotonía periódica
Síndrome de Bartter tipo IV	Cl^-	*CLC-Kb*	Disfunción renal, sordera
Fibrosis quística	Cl^-	*CFTR*	Congestión e infecciones pulmonares
Arritmias cardiacas	Na^+ K^+ Ca^{2+}	muchos genes diferentes	Latidos cardiacos irregulares o rápidos

Véase una lista más completa en *Nature Cell Biol* 6:1040, 2004, o en *Nature* 440:444, 2006.

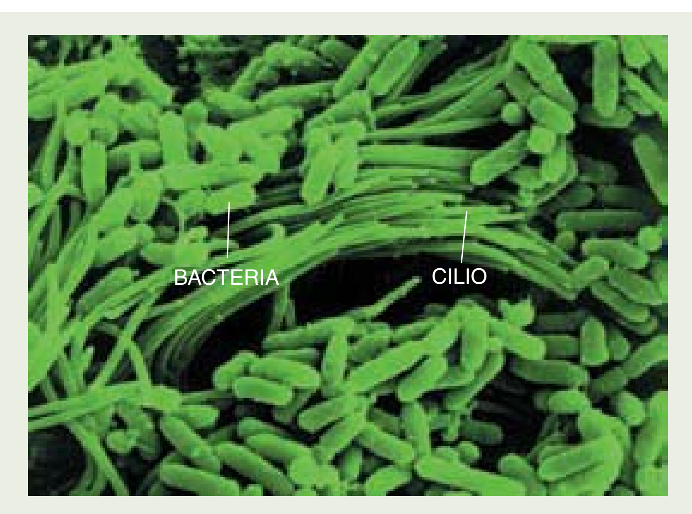


FIGURA 1 **Bacteria en forma de bacilo *P. aeruginosa*** que crece en un cultivo de células epiteliales de las vías respiratorias humanas. (Cortesía de Thomas Moninger, reimpresa con autorización de Nature 406:948, 2000; © 2000, Macmillan Magazines Limited.)

conducir a la ingestión y destrucción de la bacteria por parte de las células epiteliales. Las personas que carecen de la proteína CFTR en la membrana plasmática, como sucede con muchos pacientes con FQ (véase más adelante), tal vez sean incapaces de eliminar la bacteria de las vías respiratorias.

En el último decenio, los investigadores han identificado más de 1 000 mutaciones diferentes que causan fibrosis quística. Sin embargo, alrededor de 70% de los alelos causantes de la fibrosis quística en Estados Unidos contiene la misma alteración genética (designada ΔF508); todas las formas carecen de los tres pares de bases del DNA que codifican una fenilalanina en la posición 508, dentro de uno de los dominios de unión con nucleótidos del polipéptido CFTR. Investigaciones posteriores revelaron que los polipéptidos CFTR que carecen de este aminoácido particular no pueden procesarse en forma normal dentro de las membranas del retículo endoplásmico y, de hecho, nunca llegan a la superficie de las células epiteliales. Como resultado, los pacientes con FQ que son homocigóticos para el alelo ΔF508 tienen una ausencia absoluta del canal CFTR para el cloro en la membrana plasmática y poseen una forma grave de la enfermedad. Cuando las células de estos pacientes se cultivan a menor temperatura, la proteína mutante es transportada a la membrana plasmática, donde funciona bastante bien. Este descubrimiento ha motivado a algunas compañías farmacéuticas a buscar moléculas pequeñas capaces de unirse a estas moléculas CFTR mutantes, para prevenir su destrucción en el citoplasma y permitirles llegar a la superficie celular.

De acuerdo con una estimación, la mutación ΔF508 tuvo que originarse hace más de 50 000 años para alcanzar una frecuencia tan alta en la población. El hecho de que el gen FQ llegara a esta frecuencia sugiere que los sujetos heterocigotos pueden tener cierta ventaja selectiva sobre aquellos que carecen de una copia del gen defectuoso. Se propuso la posibilidad de que los heterocigotos para FQ estén protegidos de los efectos del cólera, una enfermedad que se caracteriza por la secreción excesiva de líquido en la pared del intestino. Una dificultad de esta proposición es que no existen registros de epidemias de cólera en Europa hasta el decenio de 1820. Una explicación alternativa sugiere que los heterocigotos están protegidos contra la fiebre tifoidea porque la bacteria causante de esta enfermedad se adhiere poco a la pared del intestino cuando las moléculas de CFTR son escasas.

Desde el aislamiento del gen causante de la FQ, el desarrollo de una curación mediante terapia genética, es decir, la sustitución del gen defectuoso con una versión normal, ha sido el principal objetivo de los investigadores en este campo. La fibrosis quística es un buen candidato para la terapia genética porque los peores síntomas de la afección se deben a las actividades defectuosas de las células epiteliales que recubren las vías respiratorias, por lo que son accesibles a los agentes que pueden aplicarse mediante inhalación de un aerosol. Se han realizado pruebas clínicas con varios tipos de sistemas de administración. En un grupo de pruebas, el gen *CFTR* normal se incorporó en el DNA de un adenovirus defectuoso, un tipo de virus que en condiciones normales causa infecciones de vías respiratorias superiores. Se permitió que las partículas virales recombinantes infectaran las células de la vía respiratoria, con lo que entregaron el gen normal a las células con la deficiencia genética. La principal desventaja del uso de adenovirus es que el DNA viral (junto con el gen *CFTR*) no se integra en los cromosomas de la célula hospedadora infectada, por lo que el virus debe administrarse con frecuencia. Como resultado, el procedimiento induce a menudo una reacción inmunitaria que elimina al virus y causa inflamación pulmonar. Los investigadores están renuentes a emplear virus que integren sus genomas, por temor a iniciar la formación de cánceres. En otras pruebas, el DNA que codifica el gen *CFTR* normal se unió con liposomas con carga positiva (pág. 128) que pueden fusionarse con las membranas plasmáticas de las células de las vías respiratorias, lo que hace llegar el contenido de DNA al citoplasma. La aplicación basada en lípidos tiene la ventaja sobre los virus de una menor probabilidad de estimulación de respuestas inmunitarias destructivas en el paciente después de tratamientos repetidos; empero, tiene la desventaja de una menor efectividad para lograr modificaciones genéticas de las células blanco. Hasta ahora, ninguna de las pruebas clínicas de terapia génica ha logrado una mejoría significativa de los procesos fisiológicos ni de los síntomas de la anormalidad. Es necesario el desarrollo de sistemas de administración de DNA más efectivos, capaces de inducir una alteración genética en un mayor porcentaje de células de las vías respiratorias, para obtener un tratamiento para la FQ con base en la terapia génica.

Uso de energía lumínica para el transporte activo de iones *Halobacterium salinarium* (antes *H. halobium*) es una arqueobacteria que vive en ambientes extremadamente salados, como el que se encuentra en el Gran Lago Salado. Cuando crecen en condiciones anaeróbicas, las membranas plasmáticas de estos procariotas adquieren color púrpura por la presencia de una proteína particular, bacteriorrodopsina. Como se muestra en la figura 4-47, la *bacteriorrodopsina* contiene retinal, el mismo grupo prostético presente en la rodopsina, la proteína que absorbe la luz en los conos de la retina de los vertebrados. La absorción de energía lumínica por el grupo retinal induce una serie de cambios en la conformación de la proteína que dan lugar al

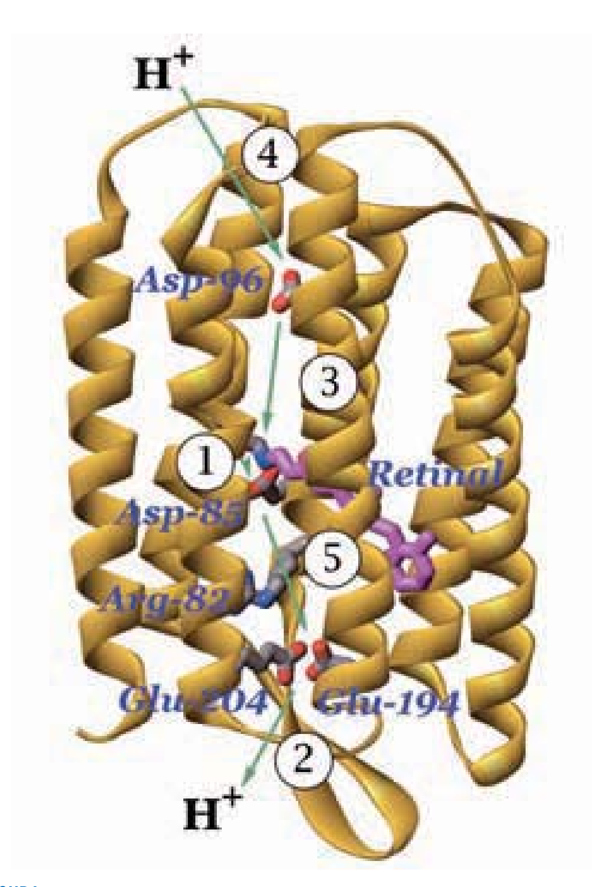


FIGURA 4-47 Bacteriorrodopsina: una bomba de protones impulsada por luz. La proteína contiene siete hélices que cruzan la membrana y un grupo retinal central (mostrado en violeta), que sirve como elemento absorbente de la luz (cromóforo). La absorción de un fotón de luz produce un cambio en la estructura electrónica del retinal, con transferencia de un protón del grupo —NH^+ a un residuo relacionado de ácido aspártico con carga negativa (#85) (paso 1). Después, el protón se libera al lado extracelular de la membrana (paso 2) por un sistema de relevo que consiste en varios residuos de aminoácido (Asp82, Glu204 y Glu194). Los espacios entre estos residuos se llenan con moléculas de agua unidas con hidrógeno que ayudan a lanzar los protones por la vía. El retinal que perdió el protón regresa a su estado original (paso 3) y acepta un protón de un residuo de ácido aspártico no disociado (Asp96) que se localiza cerca del lado citoplásmico de la membrana. En seguida, Asp96 recupera el protón mediante un H^+ del citoplasma (paso 4). Arg85 pierde un protón (paso 5) antes de recibir un protón del retinal en el siguiente ciclo de la bomba. Como resultado de estos fenómenos, los protones se mueven del citoplasma al exterior de la célula a través de un canal central en la proteína. (TOMADA DE HARTMUT LUECKE, ET AL., CORTESÍA DE JANOS K. LANYI, SCIENCE 286:255, 1999. © 1999, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE.)

movimiento de un protón del grupo retinal a través de un canal en la proteína hacia el exterior de la célula (fig. 4-47). El protón donado por el retinal excitado por la luz se sustituye por otro protón transferido a la proteína desde el citoplasma. En efecto, este proceso causa la translocación de protones del citoplasma al ambiente exterior, lo que genera un gradiente intenso de H^+ a través de la membrana plasmática. Después, una enzima sintetizadora de ATP utiliza este gradiente para fosforilar el ADP, como se describe en el capítulo siguiente.

Cotransporte: unión del transporte activo con los gradientes iónicos existentes El establecimiento de gradientes de concentración, como los del Na^+, K^+ e H^+, proporciona un medio para almacenar energía libre en la célula. La célula utiliza la energía potencial almacenada en los gradientes iónicos de varias maneras para realizar trabajo, incluido el transporte de otros solutos. Considérese la actividad fisiológica del intestino. En la luz, las enzimas hidrolizan polisacáridos de alto peso molecular hasta azúcares simples, que luego absorben las células epiteliales que recubren el intestino. El movimiento de glucosa a través de la membrana plasmática apical de las células epiteliales contra un gradiente de concentración ocurre por **cotransporte** con los iones de sodio, como se ilustra en la figura 4-48. La concentración de Na^+ se mantiene en niveles muy bajos dentro de las células por efecto del sistema de transporte activo *primario* (la ATP-asa de Na^+/K^+), localizado en la membrana plasmática basal y lateral, que bombea iones sodio fuera de las células contra un gradiente de concentración. La tendencia de los iones

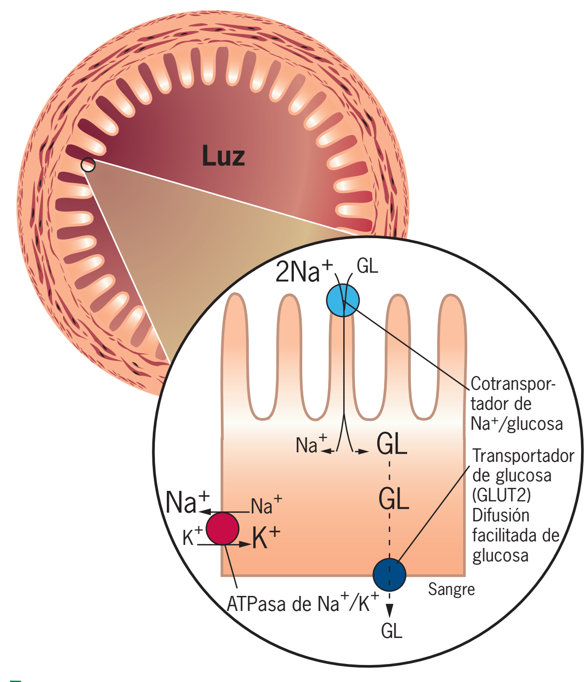


FIGURA 4-48 Transporte secundario: uso de la energía almacenada en un gradiente iónico. La ATP-asa de Na^+/K^+ que reside en la membrana plasmática de la superficie lateral mantiene una concentración citosólica muy baja de sodio. El gradiente de Na^+ a través de la membrana plasmática representa un almacén de energía que puede dirigirse para realizar trabajo, como el transporte de glucosa mediante un cotransportador de Na^+/glucosa que se localiza en la membrana plasmática apical. Una vez que se transporta a través de la superficie apical hacia el interior de la célula, las moléculas de glucosa se difunden a la superficie basal, de donde un transportador facilitador de glucosa las saca de la célula y las traslada a la corriente sanguínea. El tamaño relativo de las letras indica las direcciones de los gradientes de concentración respectivos. Por cada molécula de glucosa se transportan dos iones Na^+; la proporción 2:1 de Na^+/glucosa suministra una fuerza de impulso mucho mayor para mover glucosa hacia la célula en un índice 1:1.

sodio a regresar por la membrana plasmática apical en favor del gradiente de concentración la "aprovechan" las células epiteliales para impulsar el cotransporte de moléculas de glucosa al interior de la célula *contra* un gradiente de concentración. Se dice que el *transporte activo secundario* impulsa las moléculas de glucosa.

En este caso, la proteína transportadora, llamada *cotransportador de* Na^+*/glucosa*, mueve dos iones sodio y una molécula de glucosa con cada ciclo. En años recientes se ha dilucidado la estructura cristalina de varios cotransportadores bacterianos, lo cual ha dado origen a hipótesis antagónicas acerca de cómo funcionan estas proteínas. De manera sorpresiva, parece ser que algunos cotransportadores contienen un canal iónico controlado, lo cual difumina la distinción entre canales y bombas. Sin importar el mecanismo de captación, una vez dentro, las moléculas de glucosa se difunden por la célula y se mueven a través de la membrana basal mediante difusión facilitada (pág. 157).

Para apreciar el poder de un gradiente iónico en la acumulación de otros tipos de solutos en las células, puede considerarse en forma breve la energética del cotransportador de Na^+/glucosa. En la página 148 se describió que el cambio en la energía libre para el movimiento de un mol de iones Na^+ hacia la célula es igual a –3.1 kcal/mol, 6.2 kcal para dos moles de iones Na^+, que estarían disponibles para transportar un mol de glucosa "colina arriba" hacia el interior de la célula. Hay que recordar también que en la página 147 se mostró la ecuación para el movimiento de un no electrólito, como la glucosa, a través de la membrana

$$\Delta G = RT \ln \frac{[C_i]}{[C_o]}$$

$$\Delta G = 2.303\ RT \log_{10} \frac{[C_i]}{[C_o]}$$

Con esta ecuación se puede calcular qué tan intenso es el gradiente de concentración de la glucosa (X) que puede generar este cotransportador. A 25°C,

$$-6.2 \text{ kcal/mol} = 1.4 \text{ kcal/mol} \cdot \log_{10} X$$

$$\log_{10} X = -4.43$$

$$X = \frac{1}{23\ 000}$$

Este cálculo indica que el cotransportador de Na^+/glucosa es capaz de transportar glucosa al interior de la célula contra un gradiente de concentración mayor de 20 000 veces.

Las plantas dependen de sistemas de transporte activo secundario para captar diversos nutrimentos, como la sacarosa, aminoácidos y nitrato. En las plantas, la captación de estos compuestos se une al movimiento "colina abajo" de iones H^+ hacia el interior de la célula, en lugar de iones Na^+. El transporte activo secundario de la glucosa hacia las células epiteliales del intestino o de sacarosa a la célula vegetal son ejemplos de *simporte*, en el que las dos especies transportadas (Na^+ y glucosa o H^+ y sacarosa) se mueven en el mismo sentido. Se han aislado muchas proteínas de transporte secundario que participan en el *antiporte,* en el que las dos especies transportadas se mueven en sentidos contrarios. Por ejemplo, las células a menudo mantienen el pH citoplásmico adecuado mediante la unión del movimiento de entrada "colina abajo" del Na^+ con el movimiento hacia fuera de H^+. Las proteínas que median el antiporte suelen llamarse *intercambiadores*.

REVISIÓN ?

1. Compare y analice las cuatro formas diferentes en que una sustancia puede cruzar la membrana plasmática (como se indica en la figura 4-32).
2. Compare la diferencia energética entre la difusión de un electrólito y un no electrólito a través de la membrana.
3. Describa la relación entre el coeficiente de partición y el tamaño molecular respecto de la permeabilidad de la membrana.
4. Explique los efectos de poner una célula en un medio hipotónico, hipertónico o isotónico.
5. Describa dos formas en las que se utiliza la energía para mover iones y solutos contra un gradiente de concentración.
6. ¿Cómo ilustra la ATP-asa de Na^+/K^+ la lateralidad de la membrana plasmática?
7. ¿Cuál es el papel de la fosforilación en el mecanismo de acción de la ATP-asa de Na^+/K^+?
8. ¿Cuál es la relación estructural entre las partes del canal de K^+ KcsA de los procariotas y el canal de K^+ regulado por voltaje de los eucariotas?, ¿qué parte del canal participa en la selectividad iónica, cuál en la abertura del canal y cuál en la desactivación del canal?, ¿cómo es que ocurre cada uno de estos procesos (selectividad iónica, abertura y desactivación)?
9. A causa de su menor tamaño se esperaría que los iones Na^+ pudieran penetrar cualquier poro lo bastante grande para un ion K^+. ¿Cómo selecciona el canal del K^+ los iones específicos?

4.8 POTENCIALES DE MEMBRANA E IMPULSOS NERVIOSOS

Todos los organismos responden a la estimulación externa, una propiedad conocida como *irritabilidad.* Incluso una ameba unicelular, si se punza con una aguja fina de vidrio, responde mediante la retracción de sus seudópodos, incurvación y movimiento en otra dirección. La irritabilidad en una ameba depende de las mismas propiedades básicas de las membranas que conducen a la formación y propagación de los impulsos nerviosos, que es el tema del resto del capítulo.

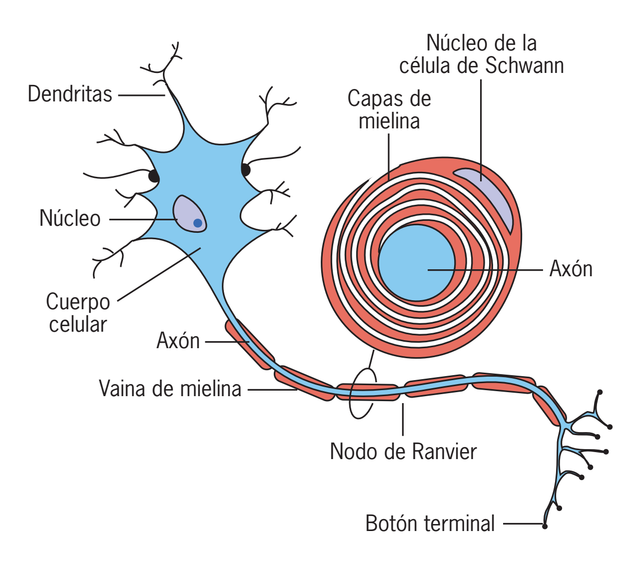


FIGURA 4-49 Estructura de una célula nerviosa. Esquema de una neurona simple con axón mielinizado. Como muestra el inserto, la vaina de mielina se forma con células de Schwann individuales que se envuelven alrededor del axón. Los sitios en los que el axón carece de la envoltura de mielina se llaman nodos de Ranvier. (*Nota:* las células formadoras de mielina dentro del sistema nervioso central se conocen como oligodendrocitos y no células de Schwann.)

Las *células nerviosas* (o *neuronas*) están especializadas para la recolección, conducción y transmisión de información, que se codifica en la forma de impulsos eléctricos que se mueven con rapidez. Las partes básicas de una neurona típica se ilustran en la figura 4-49. El núcleo de la neurona se localiza dentro de una región expandida llamada *cuerpo celular*, que es el centro metabólico de la célula y el sitio en el que se elabora la mayoría de sus materiales. Casi todas las neuronas tienen varias extensiones finas que nacen en el cuerpo celular, llamadas **dendritas**, éstas reciben la información *entrante* de fuentes externas, casi siempre de otras neuronas. Del cuerpo celular también emerge una sola extensión más prominente, el **axón**, que conduce los impulsos *salientes* lejos del cuerpo celular y hacia las células blanco. Aunque algunos axones pueden medir sólo unas cuantas micras de largo, otros se extienden muchos metros en el cuerpo de un vertebrado grande, como una jirafa o una ballena. La mayor parte de los axones se divide cerca de sus extremos en procesos más pequeños y cada uno termina en un *botón terminal*, un sitio especializado en el que los impulsos se transmiten de la neurona a la célula blanco. Algunas neuronas del cerebro terminan en miles de botones terminales, lo que hace posible que estas células cerebrales se comuniquen con miles de blancos potenciales. Como se describe en la página 167, la mayoría de las neuronas de los vertebrados están envueltas en una **vaina de mielina** rica en lípidos, cuya función se describe más adelante.

El potencial de reposo

Una diferencia de voltaje, o de potencial eléctrico entre dos puntos, como ocurre dentro y fuera de la membrana plasmática, se origina cuando hay un exceso de iones positivos en un punto y un exceso de iones negativos en otro. El voltaje a través de las membranas plasmáticas puede medirse si se inserta un fino electrodo de vidrio (o *microelectrodo*) en el citoplasma de una célula, otro electrodo en el líquido extracelular y se conectan ambos electrodos con un voltímetro, instrumento que mide una diferencia en la carga entre dos puntos (fig. 4-50). Cuando este experimento se realizó por primera vez con un axón gigante de calamar se registró una diferencia cercana a 70 milivoltios (mV), el interior negativo respecto del exterior (indicado con un signo menos, –70 mV). La presencia del potencial de membrana no es única de las células nerviosas; estos potenciales están presentes en todos los tipos de células y su magnitud varía entre –15 y –100 mV. Para las células no excitables, esto es, las que no son neuronas ni células musculares, este voltaje se denomina **potencial de membrana**. En una célula nerviosa o muscular este mismo potencial se conoce como **potencial de reposo** porque está sujeto a un cambio drástico, como se explica en la siguiente sección.

La magnitud y dirección del voltaje a través de la membrana plasmática dependen de las diferencias en las concentraciones de iones a ambos lados de la membrana y sus permeabilidades relativas. Como se describió antes en este capítulo, la ATP-asa

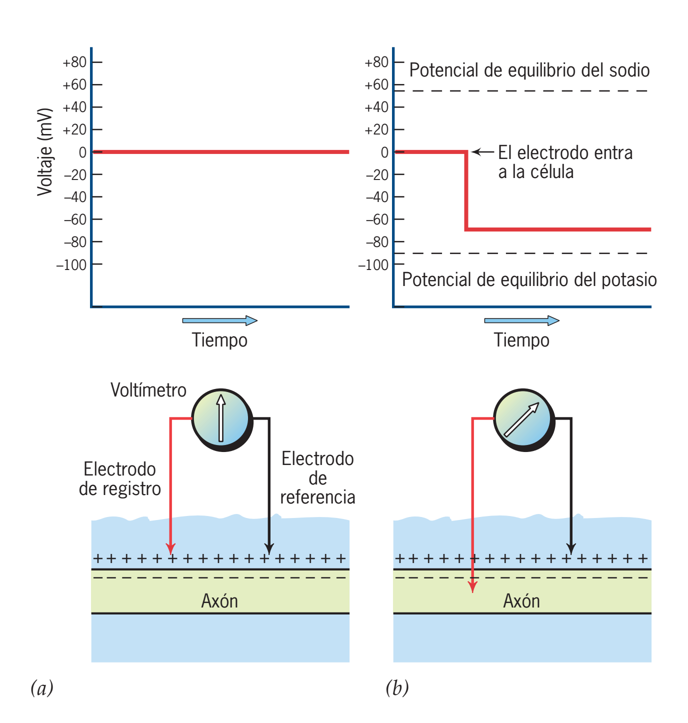


FIGURA 4-50 Medición del potencial de reposo de una membrana. Un potencial se mide cuando se detecta una diferencia en la carga entre el electrodo de referencia y el de registro. En *a*) ambos electrodos están fuera de la célula y no se percibe ninguna diferencia de potencial (voltaje). Cuando uno de los electrodos penetra la membrana plasmática del axón en *b*) el potencial cae de inmediato a –70 mV (interior negativo), lo cual se aproxima al potencial de equilibrio para los iones potasio, es decir, el potencial que se obtendría si la membrana fuera impermeable a todos los iones excepto al potasio.

de Na^+/K^+ bombea Na^+ al exterior de la célula y K^+ al interior, lo que establece gradientes pronunciados de estos dos iones a través de la membrana plasmática. A causa de estos gradientes, se podría esperar que los iones de potasio se escaparan de la célula y que los de sodio ingresaran a través de sus canales iónicos respectivos. Sin embargo, la gran mayoría de los canales iónicos que están abiertos en la membrana plasmática en la célula nerviosa *en reposo* es selectiva para K^+; con frecuencia se conocen como *canales de fuga de* K^+. Parece que estos canales de fuga de K^+ son miembros de una familia de canales del K^+ que carecen del sensor de voltaje S4 (pág. 154) y no responden a los cambios en el voltaje.

Como los iones K^+ son la única especie cargada con permeabilidad significativa en una célula nerviosa en reposo, su salida por la membrana deja un exceso de cargas negativas en el lado citoplásmico de la membrana. Aunque el gradiente de concentración a través de la membrana favorece la salida continua de K^+, el gradiente eléctrico resultante de la carga negativa excesiva en el interior de la membrana favorece la retención de iones K^+ dentro de la célula. Cuando estas dos fuerzas contrarias se contrarrestan, el sistema está en equilibrio y ya no hay más movimiento *neto* de iones K^+ a través de la membrana. Con la siguiente ecuación, llamada ecuación de Nernst, se puede calcular el potencial de membrana (V_m) que se mediría en equilibrio si la membrana plasmática de una célula nerviosa fuera permeable sólo a iones K^+.[6] En este caso, V_m sería igual al potencial de equilibrio del potasio (E_K):

$$E_K = 2.303\,\frac{RT}{zF} \cdot \log_{10}\frac{[K_o^+]}{[K_i^+]}$$

Para un axón de calamar gigante, la $[K_i^+]$ interna es cercana a 350 mM, mientras que la $[K_o^+]$ externa se aproxima a 10 mM; por lo tanto, a 25°C (298 K) y con $z = +1$ (para el ion K^+ univalente),

$$E_K = 59 \log_{10} 0.028 = -91 \text{ mV}$$

Un cálculo similar del potencial de equilibrio del Na^+ (E_{Na}) produciría un valor cercano a +55 mV. Como las mediciones de voltaje a través de la membrana nerviosa en reposo son similares en signo y magnitud (–70 mV) al potencial de equilibrio del potasio recién calculado, el movimiento de iones potasio a través de la membrana se considera el factor más importante para calcular el potencial de reposo. La diferencia entre el potencial de equilibrio de K^+ calculado (–91 mV) y el potencial de reposo medido (–70 mV, fig. 4-50) se debe a una ligera permeabilidad de la membrana a los iones Na^+ y Cl^-.

[6] La ecuación de Nernst se deriva de la ecuación que se encuentra en la página 148, con ΔG a cero, que es el caso cuando el movimiento de los iones está en equilibrio. Walther Nernst fue un fisicoquímico alemán que recibió el premio Nobel en 1920.

El potencial de acción

El conocimiento actual de los potenciales de membrana y los impulsos nerviosos procede de un conjunto de investigaciones realizadas en axones gigantes de calamar a finales del decenio de 1940 y principio del de 1950 por un grupo de fisiólogos británicos, en particular Alan Hodgkin, Andrew Huxley y Bernard Katz. Estos axones, que tienen alrededor de 1 mm de diámetro, transmiten impulsos a gran velocidad, lo que permite al calamar escapar con rapidez de sus predadores. Si la membrana de un axón de calamar en reposo se estimula mediante un pinchazo con una aguja fina o por una descarga eléctrica muy pequeña, algunos de sus canales del sodio se abren, lo que permite que una cantidad limitada de iones sodio se difundan hacia el interior de la célula. Esta oportunidad para que los iones con carga positiva entren a la célula disminuye el potencial de membrana y la vuelve menos negativa. Puesto que la carga positiva en el voltaje de la membrana causa un *descenso* de la polaridad entre los dos lados de la membrana, se llama **despolarización**.

Si el estímulo hace que la membrana se despolarice sólo en unos cuantos milivoltios, por ejemplo de –70 a –60 mV, la membrana regresa pronto a su potencial de reposo en cuanto cesa el estímulo (fig. 4-51*a*, recuadro izquierdo). Empero, si el estímulo despolariza la membrana más allá de cierto punto, denominado **umbral**, que está cerca de los –50 mV, se desencadena una serie de fenómenos. El cambio en el voltaje hace que se abran los canales del sodio activados por voltaje. Como resultado, los iones de sodio se difunden con libertad hacia el interior de la célula (fig. 4-51*a*, recuadro intermedio) en favor de los gradientes de concentración y eléctrico. La mayor permeabilidad de la membrana a los iones Na^+ y el movimiento correspondiente de la carga positiva al interior de la célula hacen que la membrana revierta el potencial por un corto tiempo (fig. 4-51*b*) y se vuelva positiva hasta cerca de +40 mV, lo cual se aproxima al potencial de equilibrio para el Na^+ (fig. 4-50).

Después de casi un milisegundo, los canales del sodio se desactivan en forma espontánea y bloquean el ingreso adicional de iones Na^+. Según la noción predominante, la desactivación se debe a la difusión aleatoria de un péptido de desactivación al interior de la abertura del poro del canal en forma similar a la descrita para los canales del K^+ en la página 154. Mientras tanto, el cambio en el potencial de membrana que ocasiona la entrada de Na^+ desencadena la abertura de los canales del potasio activados por voltaje (fig. 4-51*a,* recuadro derecho). Como resultado, los iones potasio se difunden con libertad fuera de la célula en favor de su pronunciado gradiente de concentración. La menor permeabilidad de la membrana al Na^+ y el aumento de su permeabilidad al K^+ hacen que el potencial de membrana cambie de nueva cuenta a un valor negativo cercano a –80 mV, que se aproxima al potencial de equilibrio para el K^+(fig. 4-50). El potencial de membrana negativo intenso hace que los canales del potasio activados por voltaje se cierren (véase fig. 4-42*b*), con lo cual la membrana regresa al estado de reposo. En conjunto, estos cambios en el potencial de la membrana se conocen como **potencial de acción** (fig. 4-51*b*). Toda la serie de cambios durante un potencial de acción toma sólo unos cinco milisegundos en el axón de calamar y menos de un milisegundo en una célula nerviosa mielinizada de mamífero. Como los canales del sodio no pueden abrirse de nuevo por varios milisegundos después de su desactivación, la membrana entra en un breve *periodo*

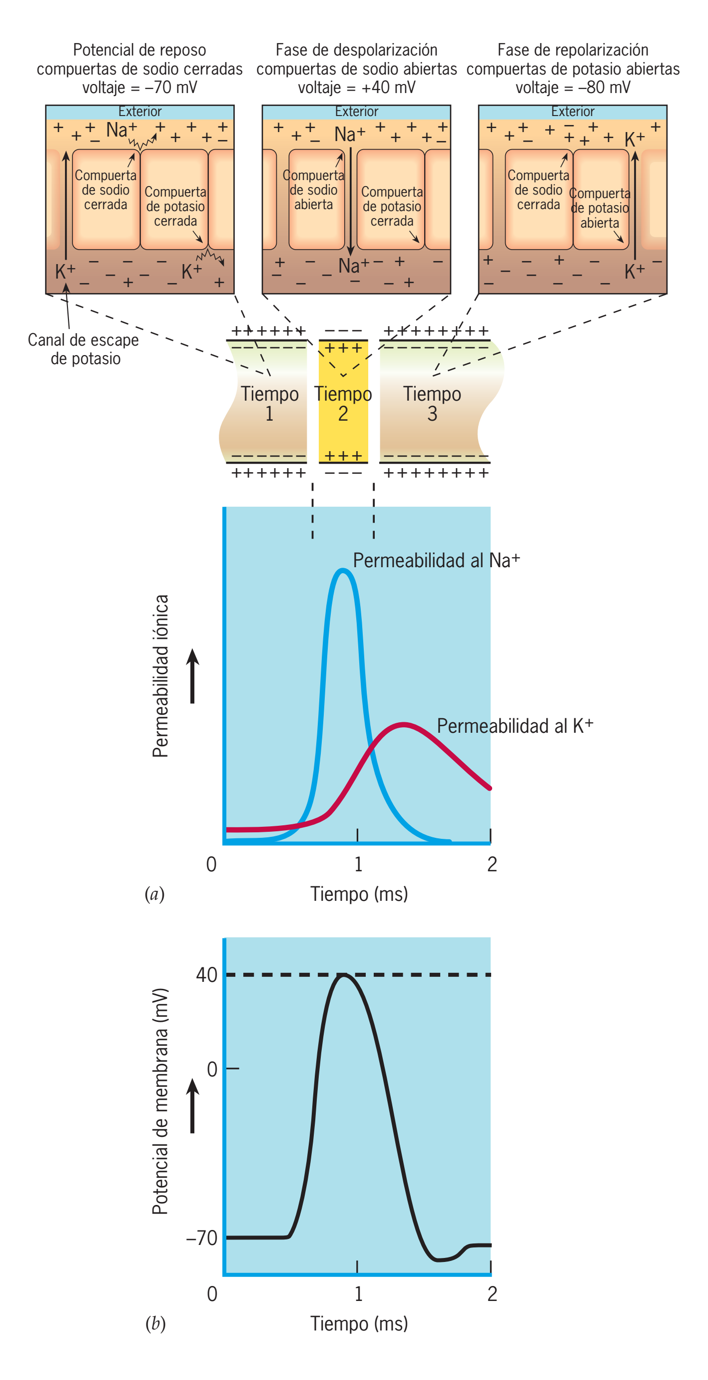


FIGURA 4-51 Formación de un potencial de acción. *a*) Tiempo 1, recuadro superior izquierdo: la membrana en esta región de la célula nerviosa mantiene el potencial de acción, en el que sólo los canales de escape del K^+ están abiertos y el voltaje de la membrana se aproxima a –70 mV. El tiempo 2, recuadro superior central, muestra la fase de despolarización: la membrana se despolarizó más allá del valor umbral, lo que abre las compuertas de sodio reguladas por voltaje y permite la entrada de iones Na^+ (indicada en el cambio de permeabilidad en la gráfica inferior). El aumento de la permeabilidad al Na^+ hace que el voltaje de la membrana se invierta en forma transitoria y alcance un valor cercano a +140 mV en el axón del calamar gigante (tiempo 2). Es esta inversión del potencial de membrana lo que constituye el potencial de acción. El tiempo 3, recuadro superior derecho, ilustra la fase de repolarización: en una diminuta fracción de segundo, las compuertas de sodio se desactivan y las compuertas del potasio se abren, lo que posibilita que los iones potasio se difundan a través de la membrana (parte inferior de la representación) y establezcan un potencial más negativo en esa región (–80 mV) que el potencial de reposo. Casi en cuanto se abren, las compuertas de potasio se cierran y dejan los canales de escape del potasio como vía primaria del movimiento de iones a través de la membrana para restablecer el potencial de reposo. *b*) Resumen de los cambios de voltaje que ocurren durante un potencial de acción, como se describe en la parte *a*.

refractario después de un potencial de acción en el cual no puede estimularse otra vez.

Aunque el potencial de acción cambia en forma drástica el voltaje de la membrana, sólo un diminuto porcentaje de los iones en ambos lados de la membrana participa en cualquier potencial de acción determinado. Los impresionantes cambios en el potencial de membrana que se ven en la figura 4-51*b* no se deben a cambios en las *concentraciones* de iones Na^+ y K^+ a los dos lados de la membrana (que son insignificantes). Se deben a los movimientos de carga en una dirección u otra que se producen por los cambios fugaces de la permeabilidad a estos iones. Los iones Na^+ y K^+ que no cambian de sitio a través de la membrana durante un potencial de acción al final se bombean de regreso por acción de la ATP-asa de Na^+/K^+. Aun si se inhibe la ATP-asa de Na^+/K^+, una neurona puede continuar a menudo la emisión de miles de impulsos antes que se disipen los gradientes iónicos establecidos por la actividad de la bomba.

Una vez que la membrana de una neurona se despolariza hasta el valor umbral, se inicia un potencial de acción completo sin más estímulo. Esta característica fisiológica de la célula nerviosa se conoce como *ley del todo o nada.* No hay puntos intermedios; la despolarización inferior al umbral es incapaz de iniciar un potencial de acción, mientras que una despolarización umbral induce en forma automática una respuesta máxima. También vale la pena notar que un potencial de acción no es un proceso que requiere energía, pero se produce por el flujo de iones en favor de sus respectivos gradientes electroquímicos. La ATP-asa de Na^+/K^+ requiere energía para generar los gradientes iónicos marcados a través de la membrana plasmática, pero una vez que se logra, los diversos iones se equilibran para fluir a través de la membrana en cuanto se abren sus canales iónicos.

Los movimientos de iones a través de la membrana plasmática de las células nerviosas establecen la base para la comunicación neural. Ciertos anestésicos *locales*, como la procaína y la novocaína, actúan mediante el cierre de canales iónicos en las membranas de las células sensitivas y neuronas. Mientras estos canales iónicos permanezcan cerrados, las células afectadas son incapaces de generar potenciales de acción y, por lo tanto, de informar al cerebro sobre los sucesos que ocurren en la piel o los dientes.

Propagación de los potenciales de acción como un impulso

Hasta ahora, la descripción se ha limitado a los fenómenos que ocurren en un sitio particular de la membrana celular nerviosa en el que la despolarización experimental originó el potencial de

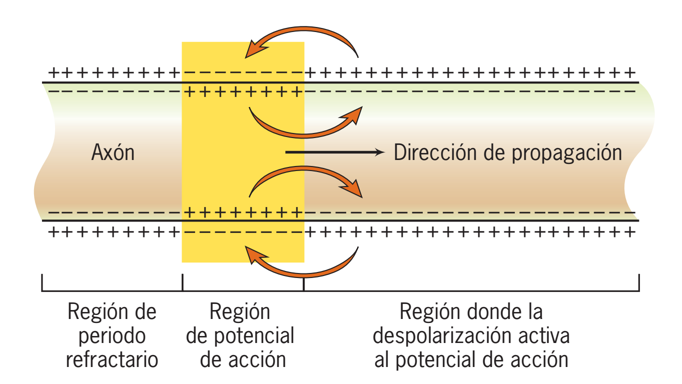


FIGURA 4-52 La propagación de un impulso se debe al flujo local de iones. Un potencial de acción en un sitio de la membrana despolariza una región adyacente de la membrana, lo que desencadena un potencial de acción en el segundo sitio. El potencial de acción sólo puede fluir en sentido anterógrado porque la porción de la membrana que acaba de experimentar el potencial de acción está en un periodo refractario.

acción. Una vez que se inició el potencial de acción, no permanece localizado en un sitio particular, sino que se *propaga* como **impulso nervioso** a lo largo de la célula hasta las terminaciones nerviosas.

Los impulsos nerviosos se propagan a lo largo de la membrana porque un potencial de acción en un sitio tiene un efecto sobre el sitio adyacente. La despolarización que acompaña a un potencial de acción crea una diferencia en la carga en las superficies interna y externa de la membrana plasmática (fig. 4-52). Como resultado, los iones positivos se mueven hacia el sitio de la despolarización sobre la superficie externa de la membrana y lejos del sitio por la superficie interna (fig. 4-52). Este flujo local de corriente hace que la membrana que está justo delante del potencial de acción se despolarice. Como la despolarización que acompaña al potencial de acción es muy grande, la membrana de las regiones adyacentes se despolariza con facilidad hasta un nivel mayor al valor umbral, lo cual abre los canales del sodio en esta región adyacente y genera otro potencial de acción. Por consiguiente, una vez emitido, una sucesión de potenciales de acción recorre toda la longitud de la neurona sin que se pierda intensidad; al final llega a la célula blanco con la misma fuerza que tenía en su punto de origen.

Como todos los impulsos que viajan a lo largo de una neurona tienen la misma fuerza, los estímulos más fuertes no producen impulsos "más grandes" que los estímulos más débiles. Incluso así, las personas son capaces de detectar las diferencias en la fuerza de un estímulo. La capacidad para hacer discriminaciones sensoriales depende de varios factores. Por ejemplo, un estímulo más fuerte, como el agua muy caliente, activa más células nerviosas que un estímulo más débil, como el agua tibia. También activa las neuronas de "umbral alto" que permanecerían en reposo si el estímulo fuera más débil. La fuerza del estímulo también se codifica por el patrón y frecuencia con que se emiten los potenciales de acción en una neurona particular. En la mayoría de los casos, mientras más fuerte sea el estímulo, mayor es el número de impulsos generados.

La velocidad es esencial Cuanto mayor sea el diámetro de un axón, menor es la resistencia al flujo local de corriente y mayor la rapidez con que un potencial de acción en un sitio puede activar las regiones adyacentes de la membrana. Algunos invertebrados, como el calamar y los gusanos redondos, desarrollaron axones gigantes que facilitan el escape del animal en caso de peligro. Sin embargo, existe un límite a esta conducta evolutiva. Como la velocidad de conducción aumenta con la raíz cuadrada del aumento del diámetro, un axón que mide 480 μm de diámetro puede conducir un potencial de acción con una velocidad cuatro veces mayor que uno de 30 μm de diámetro.

Durante la evolución de los vertebrados se logró una mayor velocidad de conducción cuando el axón se envolvió en una vaina de mielina (véanse figs. 4-5 y 4-49). Como está compuesta de múltiples capas de membranas que contienen lípidos, la vaina de mielina es ideal para prevenir el paso de iones a través de la membrana plasmática. Además, casi todos los canales iónicos para el Na^+ de una neurona mielinizada se encuentran en las hendiduras desnudas, o *nodos de Ranvier,* entre las células de Schwann adyacentes u oligodendrocitos, que forman la vaina (véase fig. 4-49). En consecuencia, los nodos de Ranvier son los únicos sitios en los que pueden generarse potenciales de acción. Un potencial de acción en un nodo desencadena un potencial de acción en el nodo siguiente (fig. 4-53), lo que hace que el impulso salte de un nodo a otro sin tener que activar la membrana intermedia. La propagación de un impulso por este mecanismo se llama **conducción saltatoria**. Los impulsos se conducen a lo largo del axón mielinizado a velocidades de hasta 120 metros por segundo, que es más de 20 veces mayor a la velocidad con la que discurren los impulsos en una neurona no mielinizada del mismo diámetro.

La importancia de la mielinización se ilustra de manera espectacular con la esclerosis múltiple, una enfermedad en la que hay deterioro de la vaina de mielina que rodea los axones de varias partes del sistema nervioso. Las manifestaciones de la enfermedad casi siempre empiezan en el adulto joven; los pacientes presentan debilidad en las manos, dificultad para caminar y problemas visuales.

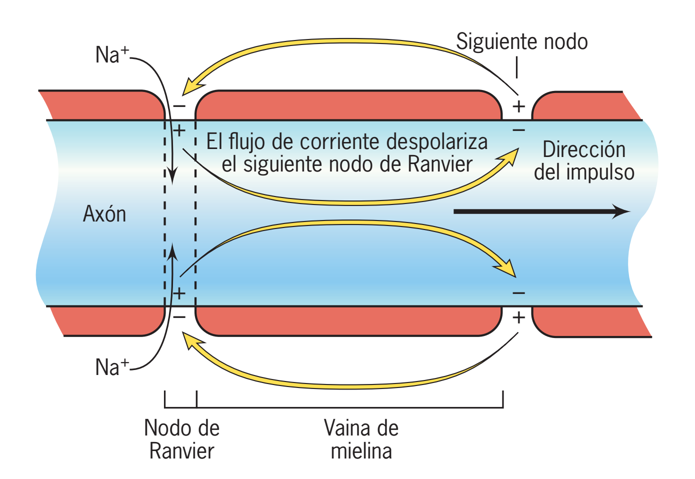


FIGURA 4-53 Conducción saltatoria. Durante la conducción saltatoria, sólo la membrana en la región nodal del axón se despolariza y es capaz de establecer un potencial de acción. Esto se logra cuando la corriente fluye en forma directa de un nodo activado al siguiente nodo en reposo a lo largo del axón.

Neurotransmisión: salto de la hendidura sináptica

Las neuronas están vinculadas con sus células blanco mediante uniones especiales llamadas **sinapsis**. El examen cuidadoso de una sinapsis revela que las dos células no hacen contacto directo, sino que están separadas por una estrecha brecha de 20 a 50 nm. Esta brecha se llama **hendidura sináptica**. Una **célula presináptica** (célula sensitiva o una neurona) conduce los impulsos hacia una sinapsis y una **célula postsináptica** (una neurona, célula muscular o glandular) siempre está en el lado receptor de una sinapsis. La figura 4-54 muestra varias sinapsis entre las ramas terminales de un axón y una célula de músculo esquelético; las sinapsis de este tipo se denominan **uniones neuromusculares**.

¿Cómo es que un impulso en una neurona presináptica salta la hendidura sináptica y afecta a la célula postsináptica? Los estudios realizados hace décadas indicaron que una sustancia química participa en la transmisión de un impulso de una célula a otra (pág. 171). Con el microscopio electrónico, se observó que las puntas (botones terminales) de las ramas de un axón parecen contener grandes cantidades de **vesículas sinápticas** (fig. 4-54, inserto izquierdo) que sirven como sitios de almacenamiento para los transmisores químicos que actúan en las células postsinápticas. Dos de los **neurotransmisores** mejor estudiados son la acetilcolina y la noradrenalina,

$$CH_3-\overset{\overset{\displaystyle O}{\|}}{C}-O-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3$$

Acetilcolina (ACh)

$$HO-C_6H_3(OH)-\underset{\underset{\displaystyle OH}{|}}{\overset{\overset{\displaystyle H}{|}}{C}}-CH_2-\overset{+}{N}H_3$$

Noradrenalina

que transmiten impulsos a los músculos esquelético y cardiaco.

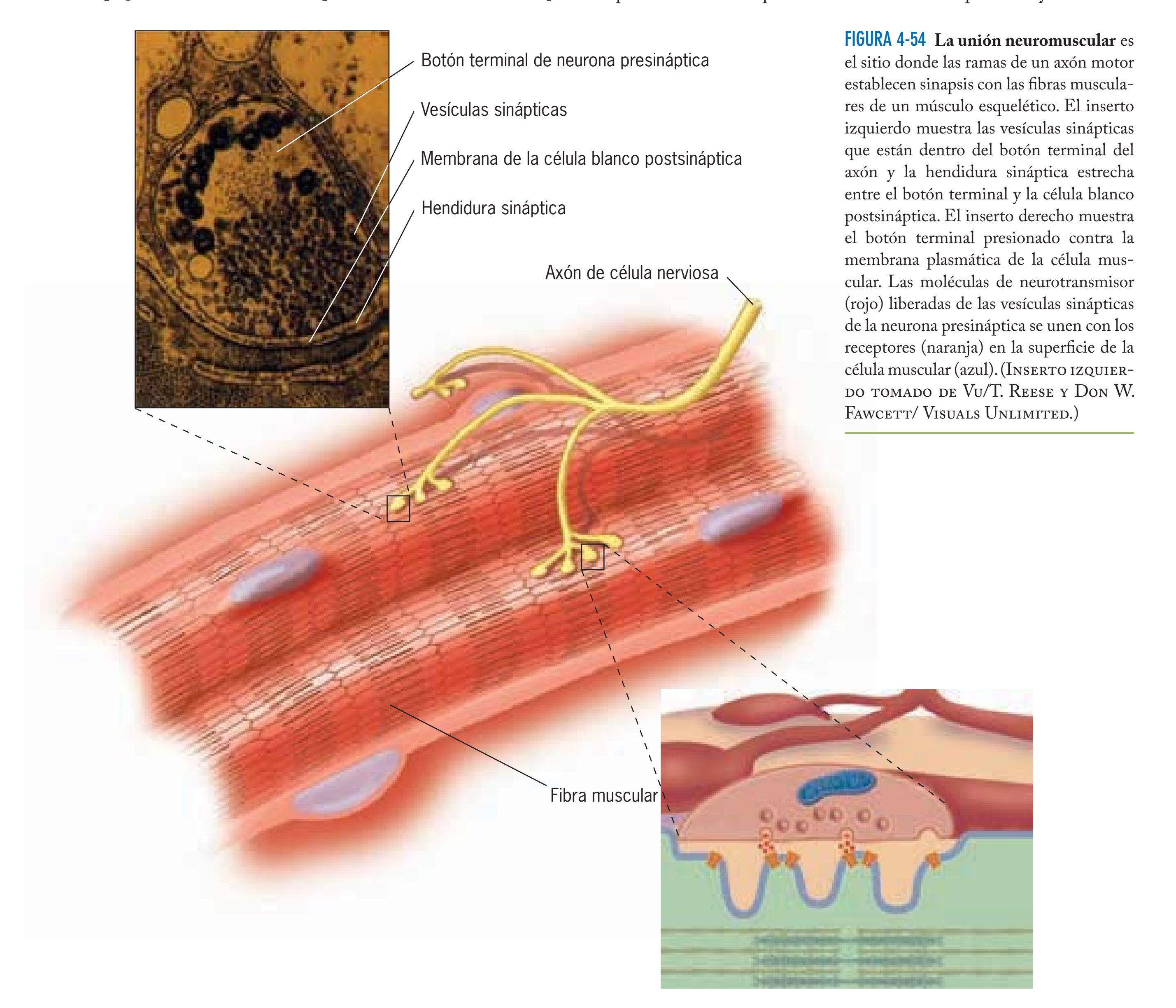


FIGURA 4-54 La unión neuromuscular es el sitio donde las ramas de un axón motor establecen sinapsis con las fibras musculares de un músculo esquelético. El inserto izquierdo muestra las vesículas sinápticas que están dentro del botón terminal del axón y la hendidura sináptica estrecha entre el botón terminal y la célula blanco postsináptica. El inserto derecho muestra el botón terminal presionado contra la membrana plasmática de la célula muscular. Las moléculas de neurotransmisor (rojo) liberadas de las vesículas sinápticas de la neurona presináptica se unen con los receptores (naranja) en la superficie de la célula muscular (azul). (INSERTO IZQUIERDO TOMADO DE VU/T. REESE Y DON W. FAWCETT/ VISUALS UNLIMITED.)

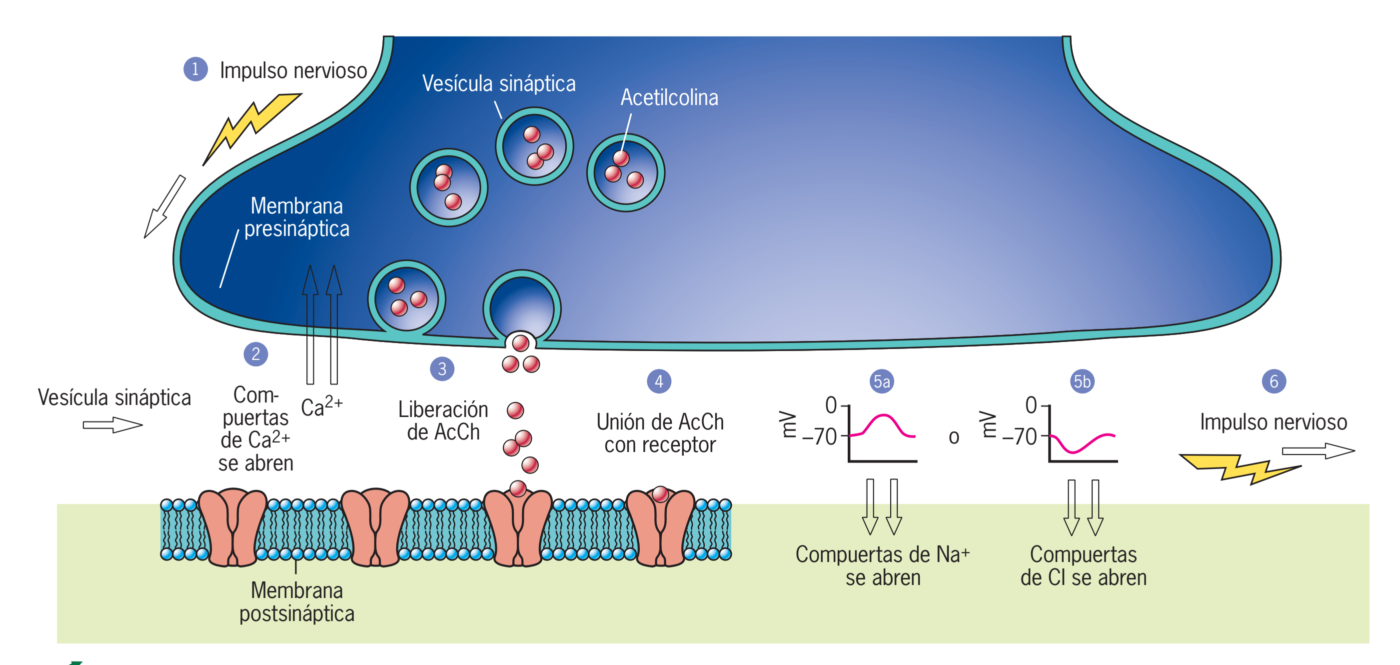


FIGURA 4-55 Secuencia de fenómenos durante la transmisión sináptica con acetilcolina como neurotransmisor. Durante los pasos 1 a 4, un impulso nervioso llega al botón terminal del axón, las compuertas de calcio se abren y permiten la entrada de Ca^{2+}, se libera acetilcolina de las vesículas sinápticas y se une con los receptores que hay en la membrana postsináptica. Si la unión de las moléculas de neurotransmisor causa una despolarización de la membrana postsináptica (como en 5a), puede generarse un impulso nervioso en ese sitio (6). Sin embargo, si la unión del neurotransmisor causa hiperpolarización de la membrana postsináptica (5b), la célula blanco se inhibe y se dificulta más la generación de un impulso en la célula blanco por otro estímulo excitatorio. No se muestra la degradación del neurotransmisor por la acetilcolinesterasa.

La secuencia de fenómenos de la transmisión sináptica puede resumirse como sigue (fig. 4-55). Cuando un impulso llega a un botón terminal (paso 1, fig. 4-55), la despolarización que lo acompaña induce a la abertura de varios canales del Ca^{2+} activados por voltaje en la membrana plasmática de esta parte de la célula nerviosa presináptica (paso 2, fig. 4-55). En condiciones normales, los iones de calcio están en concentraciones muy bajas dentro de la neurona (unos 100 nM), al igual que en todas las células. Cuando la compuerta se abre, los iones de calcio se difunden del líquido extracelular al botón terminal de la neurona, lo que hace que la concentración de calcio se eleve más de 1 000 veces dentro de microdominios localizados cerca de los canales. La elevada concentración de Ca^{2+} inicia la fusión rápida de una o más vesículas sinápticas cercanas con la membrana plasmática, lo que da lugar a la liberación de moléculas de neurotransmisor hacia la hendidura sináptica (paso 3, fig. 4-55).

Ya liberadas de las vesículas sinápticas, las moléculas de neurotransmisor se difunden a través de la hendidura estrecha y se unen selectivamente con las moléculas receptoras que se concentran en el lado opuesto de la hendidura, en la membrana plasmática postsináptica (paso 4, fig. 4-55). Una molécula de neurotransmisor puede tener uno de dos efectos opuestos, según sea el tipo de receptor en la membrana de la célula blanco al que se une:[7]

1. El transmisor unido puede iniciar la abertura de canales catiónicos selectivos en la membrana, lo que produce sobre todo entrada de iones sodio y un potencial de membrana menos negativo (más positivo). Esta despolarización de la membrana postsináptica *excita* a la célula, lo que aumenta la probabilidad de responder a este o a estímulos subsiguientes mediante la generación de un potencial de acción propio (fig. 4-55, pasos 5a y 6).
2. El transmisor unido puede desencadenar la abertura de canales aniónicos selectivos, lo que produce entrada de iones cloro y un potencial de membrana más negativo (hiperpolarizado). La hiperpolarización de la membrana postsináptica disminuye la probabilidad de que la célula genere un potencial de acción porque luego se requiere mayor entrada de sodio para alcanzar el umbral de la membrana (fig. 4-55, paso 5b).

La mayoría de las células nerviosas del cerebro recibe señales excitatorias e inhibitorias de muchas neuronas presinápticas diferentes. La suma de estas influencias opuestas es lo que determina que se genere o no un impulso en la neurona postsináptica.

Todos los botones terminales de una neurona determinada liberan el mismo neurotransmisor. Sin embargo, un neurotransmisor determinado puede tener un efecto estimulante en una membrana postsináptica particular y un efecto inhibitorio en otra. Por ejemplo, la acetilcolina inhibe la contractilidad del corazón, pero estimula la del músculo esquelético. Dentro del cerebro, el glutamato actúa como principal neurotransmisor excitatorio y el ácido gammaaminobutírico (GABA) como el principal neurotransmisor inhibitorio. Varios anestésicos generales, así como el diacepam y sus derivados, actúan mediante la

[7] Es importante observar que esta exposición pasa por alto una clase importante de receptores de neurotransmisor que no son canales iónicos y por tanto no afectan *directamente* el voltaje de membrana. Este otro grupo de receptores consiste en miembros de una clase de proteínas llamadas GPCR, que se consideran en detalle en la sección 15.3. Cuando un neurotransmisor se une a uno de estos receptores, puede iniciar diversas respuestas, que a menudo incluyen la abertura de canales iónicos por un mecanismo indirecto.

unión con el receptor para GABA e intensifican la actividad del principal interruptor de "apagado" del cerebro.

Acciones de los fármacos sobre las sinapsis Es importante que un neurotransmisor sólo tenga una vida media corta después de su liberación de la neurona presináptica; de lo contrario, el efecto del neurotransmisor se extendería y la neurona postsináptica no se recuperaría. El neurotransmisor se elimina de la sinapsis de dos maneras: por enzimas que destruyen las moléculas de neurotransmisor en la hendidura sináptica y por proteínas que transportan las moléculas de neurotransmisor de regreso a las terminaciones presinápticas, proceso conocido como *recaptación.* Gracias a la destrucción o recaptación de las moléculas de neurotransmisor, el efecto de cada impulso no dura más que unos cuantos milisegundos.

La interferencia con la destrucción o recaptación de los neurotransmisores puede tener efectos fisiológicos y conductuales muy intensos. La acetilcolinesterasa es una enzima que hidroliza la acetilcolina y se localiza en la hendidura sináptica. Si esta enzima se inhibe por exposición al gas nervioso DFP, por ejemplo, los músculos presentan una contracción violenta debido a la presencia continua de las concentraciones altas de acetilcolina.

Muchos fármacos actúan inhibiendo los transportadores que extraen neurotransmisores de la hendidura sináptica. Varios antidepresores que se prescriben ampliamente, como la fluoxetina, inhiben la recaptación de serotonina, un neurotransmisor implicado en trastornos del estado de ánimo. Por otro lado, la cocaína interfiere con la recaptación del neurotransmisor dopamina que liberan ciertas células nerviosas en una porción del cerebro conocida como sistema límbico. Éste contiene los centros cerebrales del "placer" o la "recompensa". La presencia sostenida de dopamina en las hendiduras sinápticas del sistema límbico produce una sensación transitoria de euforia, así como un intenso deseo de repetir la actividad. Con el uso repetido, los efectos placenteros de la droga disminuyen cada vez más, pero sus propiedades adictivas se intensifican. Las anfetaminas también actúan en las neuronas que liberan dopamina; se cree que estimulan la liberación excesiva de dopamina de las terminaciones presinápticas e interfieren con la recaptación de las moléculas de neurotransmisor de la hendidura sináptica. Los ratones sometidos a modificaciones genéticas para carecer del transportador de dopamina (DAT), la proteína encargada de la recaptación de la dopamina, tienen comportamiento similar al de ratones normales que recibieron cocaína o anfetaminas. La administración de estas drogas no tuvo efectos adicionales en el comportamiento de animales que carecen del gen *DAT*.

El compuesto activo de la marihuana (Δ^9-tetrahidrocanabinol) actúa por un mecanismo muy diferente. Se une con los receptores canabinoides (CB1) localizados en las terminaciones *presinápticas* de ciertas neuronas del cerebro, lo cual reduce la probabilidad de que estas neuronas liberen neurotransmisores. En condiciones normales, los receptores CB1 interactúan con compuestos llamados *endocanabinoides*. Éstos se producen en neuronas postsinápticas después de la despolarización. Tales sustancias se difunden "hacia atrás" a través de la hendidura sináptica hacia la membrana presináptica, donde se unen con los receptores CB1 y suprimen la actividad sináptica. Los receptores CB1 se hallan en muchas áreas del cerebro, incluidos hipocampo, cerebelo e hipotálamo, lo cual explica los efectos de la marihuana en la memoria, la coordinación motora y el apetito, respectivamente. Si la marihuana incrementa el apetito al unirse a receptores CB1, se piensa que bloquear estos receptores podría reducir el apetito. Esta línea de razonamiento ha llevado al desarrollo de un nuevo fármaco bloqueador de CB1 para reducir el apetito llamado Acomplia, que tal vez esté disponible en un futuro cercano.

Plasticidad sináptica Las sinapsis son más que simples sitios de conexión entre neuronas adyacentes; son los determinantes clave para establecer las rutas de los impulsos a través del sistema nervioso. Se piensa que el cerebro humano contiene cuando menos cien billones (10^{14}) de sinapsis. Estas sinapsis actúan como compuertas dispuestas a lo largo de varias vías, permitiendo que cierta información pase de una neurona a otra, mientras detienen otros fragmentos de información o los desvían en otra dirección. Aunque las sinapsis se perciben a menudo como estructuras fijas y sin cambios, pueden presentar una notable calidad dinámica conocida como "plasticidad sináptica". La plasticidad sináptica es muy importante durante la lactancia y la infancia, cuando los circuitos neuronales del cerebro alcanzan su configuración madura.

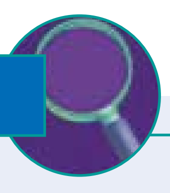
La plasticidad sináptica es más fácil de observar en estudios de neuronas del hipocampo, una parte del cerebro vital para el aprendizaje y la memoria a corto plazo. El hipocampo es una de las áreas principales del cerebro que se destruye en la enfermedad de Alzheimer (pág. 66). Cuando las neuronas del hipocampo se estimulan en forma repetida en poco tiempo, las sinapsis que conectan estas neuronas con sus contiguas se "fortalecen" por un proceso conocido como potenciación a largo plazo (LTP), que puede durar días, semanas o aun más. La investigación sobre la LTP se ha enfocado en el receptor NMDA, que es uno de los diversos tipos de receptores que se unen con el neurotransmisor excitatorio glutamato. Cuando el glutamato se une con el receptor NMDA postsináptico, abre un canal catiónico interno que permite la entrada de iones Ca^{2+} hacia la neurona postsináptica, lo cual inicia una cascada de cambios bioquímicos que conducen al fortalecimiento sináptico. Las sinapsis que se sometieron a la LTP pueden transmitir estímulos más débiles e inducen respuestas más fuertes en las células postsinápticas. Se cree que estos cambios tienen un papel principal conforme la información recién aprendida o los recuerdos recientes se codifican en los circuitos neuronales del cerebro. Cuando los animales de laboratorio se tratan con fármacos que inhiben la LTP, como los que interfieren con la actividad del receptor NMDA, su capacidad para aprender información nueva se reduce de forma notoria.

Muchas otras razones hacen tan importante el estudio de las sinapsis. Por ejemplo, se cree que diversas enfermedades del sistema nervioso, entre ellas la miastenia grave, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia e incluso la depresión, tienen sus orígenes en la disfunción sináptica.

REVISIÓN ?

1. ¿Qué es el potencial de reposo?, ¿cómo se establece como resultado del flujo iónico?
2. ¿Qué es un potencial de acción?, ¿cuáles son los pasos que conducen a sus diversas fases?
3. ¿Cómo se propaga un potencial de acción a lo largo de un axón?, ¿qué es la conducción saltatoria y cómo se produce este proceso?
4. ¿Cuál es el papel de la vaina de mielina en la conducción de un impulso?
5. Describa los pasos entre el tiempo en que un impulso llega al botón terminal de una neurona presináptica y cuando se inicia un potencial de acción en una célula postsináptica.
6. Compare los papeles de las bombas y canales iónicos para establecer y usar los gradientes iónicos, sobre todo en su aplicación a las células nerviosas.

VÍAS EXPERIMENTALES



El receptor de acetilcolina

En 1843, a la edad de 30 años, Claude Bernard se mudó de un pequeño pueblo francés, donde había sido farmacéutico y aspirante a escritor de obras, a París, donde planeó seguir su carrera literaria. En lugar de eso, Bernard se inscribió en la escuela de medicina y se convirtió en el principal fisiólogo del siglo XIX. Entre sus múltiples intereses estaba el mecanismo por el cual los nervios estimulan la contracción de los músculos esqueléticos. Sus estudios incluyeron el uso de curare, una droga muy tóxica aislada de plantas tropicales y empleada durante siglos por los cazadores nativos de Sudamérica para preparar dardos envenenados. Bernard encontró que el curare paralizaba un músculo esquelético sin interferir con la capacidad de los nervios para transmitir impulsos al músculo en cuestión ni la capacidad del músculo para contraerse con la estimulación directa. Bernard concluyó que, de alguna manera, el curare actuaba sobre la región de contacto entre el nervio y el músculo.

John Langley, un fisiólogo de la *Cambridge University*, confirmó y amplió esta conclusión. Langley estudiaba la capacidad de la nicotina, otra sustancia derivada de las plantas, para estimular la contracción de músculos esqueléticos aislados de rana y el efecto del curare para inhibir la acción de la nicotina. En 1906, Langley concluyó que "el impulso nervioso no debe pasar del nervio al músculo por una descarga eléctrica, sino por la secreción de una sustancia especial en el extremo del nervio".[1] Langley propuso que este "transmisor químico" se unía a una "sustancia receptora" en la superficie de las células musculares, el mismo sitio al que se unían la nicotina y el curare. Éstas resultaron ser propuestas visionarias.

La sugerencia de Langley de que el estímulo del nervio al músculo se transmite por una sustancia química se confirmó en 1921 en un experimento ingenioso realizado por el fisiólogo australiano Otto Loewi, cuyo diseño concibió durante un sueño. La frecuencia cardiaca de los vertebrados está regulada por dos nervios antagónicos (opositores). Loewi aisló el corazón de la rana con ambos nervios intactos. Cuando estimuló el nervio inhibidor (*vago*), se liberó una sustancia de la preparación del corazón hacia la solución salina y se permitió que drenara hacia el medio que bañaba un segundo corazón aislado. La frecuencia del segundo corazón disminuyó en forma drástica, como si se hubiera activado su propio nervio inhibidor.[2] Loewi llamó Vagusstoff a la sustancia causante de la inhibición del corazón de la rana. Unos cuantos años después, Loewi había demostrado que las propiedades químicas y fisiológicas del Vagusstoff eran idénticas a las de la acetilcolina (ACh) y concluyó que ésta era la sustancia que se liberaba de las células nerviosas que formaban el nervio vago.

En 1937, David Nachmansohn, un neurofisiólogo de la Sorbona, visitaba la Feria Mundial en París y ahí observó varios peces eléctricos vivos de la especie *Torpedo marmarota* que estaban en exhibición. Estas rayas tienen órganos eléctricos que producen choques intensos (40 a 60 voltios) capaces de matar a la presa potencial. En esa época, Nachmansohn estudiaba la enzima acetilcolinesterasa, que destruye la acetilcolina después de su liberación de las puntas de los nervios motores. Nachmansohn estaba consciente de que los órganos eléctricos de estos peces se derivaban del tejido muscular esquelético modificado

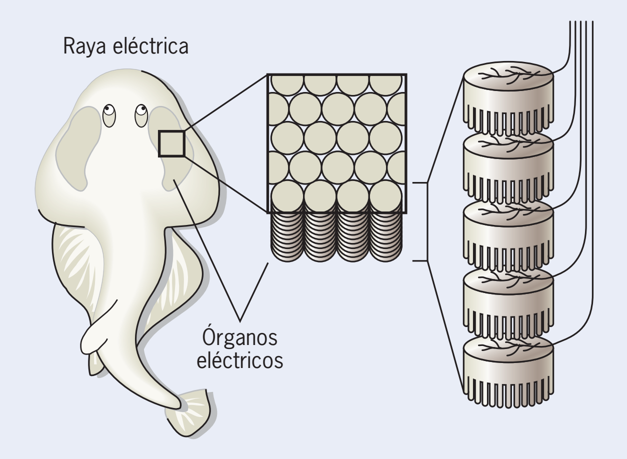


FIGURA 1 Los órganos eléctricos del pez *Torpedo* consisten en pilas de uniones neuromusculares modificadas que se localizan a ambos lados del cuerpo. (TOMADA DE Z. W. HALL, AN INTRODUCTION TO NEUROBIOLOGY, SINAUER ASSOCIATES, INC., SUNDERLAND, MA © 1992.)

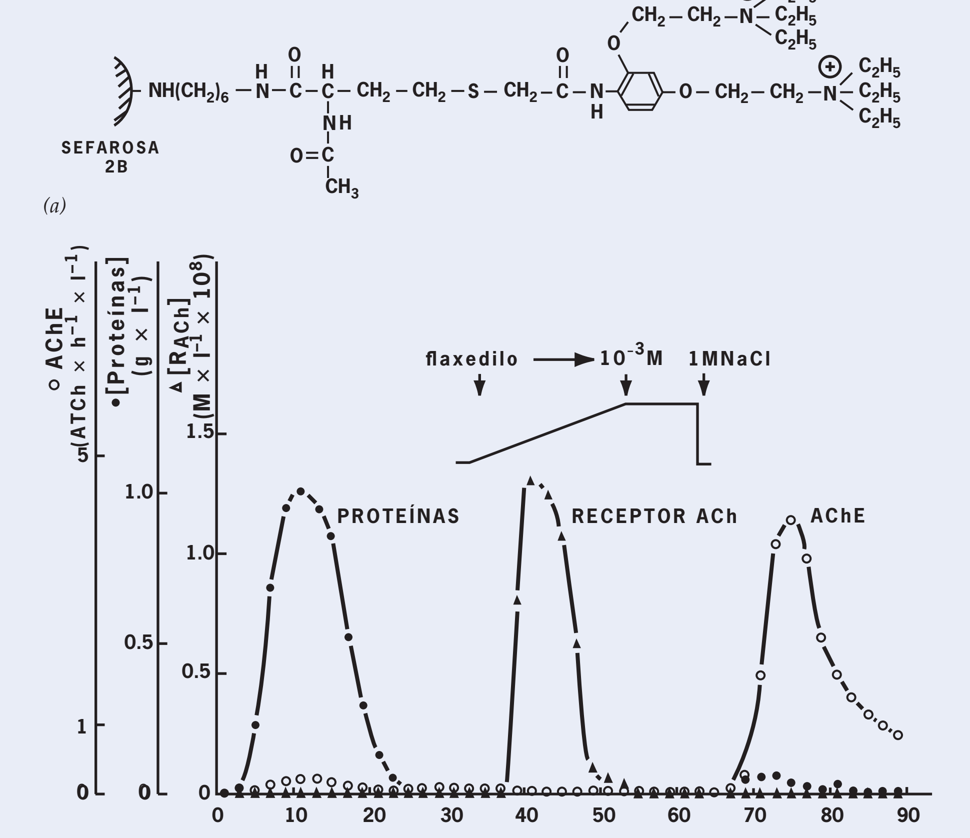


FIGURA 2 Pasos empleados para el aislamiento del nAChR. *a*) Estructura de un compuesto sintético, CT5263, que se unió con cuentas de sefarosa para formar una columna de afinidad. Los extremos del compuesto que sobresalen de las cuentas simulan acetilcolina, lo que hace que la acetilcolinesterasa (AChE) y el receptor nicotínico para acetilcolina (nAChR) se unan con las cuentas. *b*) Cuando el extracto Triton X-100 pasó por la columna, las proteínas de unión con acetilcolina se unieron con las cuentas, en tanto la proteína disuelta restante (cerca de 90% del total de proteína en el extracto) pasó directamente por la columna. El paso ulterior de una solución de flaxedilo 10^{-3} M por la columna liberó el nAChR unido sin alterar la AChE adherida (que luego se separó con NaCl 1 M). (Tomada de R. W. Olsen, J.-C. Meunier y J.-P. Changeux, FEBS Lett 28:99, 1972.)

(fig. 1) y preguntó si podría tener una pareja de los peces para estudiarlos una vez que la feria terminara. Los resultados de la primera prueba mostraron que el órgano eléctrico era una fuente extraordinariamente rica de acetilcolinesterasa.[3] También tenía abundancia de receptores nicotínicos para acetilcolina (nAChR),* el receptor presente en las membranas postsinápticas de las células de músculo esquelético que se une con las moléculas de ACh liberadas de las terminaciones de un nervio motor. El hallazgo de un sistema ideal puede resultar invaluable para el estudio de un aspecto particular de la estructura o función celulares. Como resulta evidente en la descripción siguiente, los órganos eléctricos del pez habían sido la única fuente de material para el estudio del nAChR.

El nAChR es una proteína integral de la membrana y no fue sino hasta el decenio de 1970 que se desarrollaron las técnicas para aislar estas proteínas. Como se explica en el capítulo 18, la purificación de una proteína particular requiere una prueba adecuada para identificar la cantidad de proteína presente en cualquier fracción particular. La prueba ideal para nAChR fue un compuesto que se une en forma selectiva y con firmeza a esta proteína particular. Este compuesto lo descubrieron en 1963, Chen-Yuan Lee y colaboradores de la *Universidad Nacional de Taiwán*. El compuesto era la bungarotoxina alfa, una sustancia presente en el veneno de una serpiente de Taiwán. La bungarotoxina alfa causa parálisis porque se une con firmeza al nAChR en la membrana postsináptica de las células musculares esqueléticas, lo que bloquea la respuesta del músculo a la acetilcolina.[4]

Equipados con bungarotoxina alfa marcada para usarla en una prueba, órganos eléctricos como fuente y un detergente capaz de disolver las proteínas de membrana, varios investigadores pudieron aislar los receptores para acetilcolina a principios de 1970. En uno de estos estudios,[5] las membranas que contienen nAChR se aislaron mediante homogenización de los órganos eléctricos en una mezcla y la suspensión se centrifugó para separar los fragmentos de membrana. Las proteínas de membrana se extrajeron de los fragmentos de membrana con Triton X-100 (pág. 132) y la mezcla se pasó por una columna que tenía cuentas diminutas cubiertas con un compuesto sintético cuyos extremos tenían similitud estructural con la acetilcolina (fig. 2*a*). Conforme la mezcla de proteínas disueltas pasaba por la columna, dos proteínas que poseen sitios de unión para la acetilcolina, nAChR y acetilcolinesterasa (AChE), se pegaron a las cuentas. El 90% restante de la proteína del extracto no se unió con las cuentas y tan sólo pasó por la columna y se recolectó (fig. 2*b*). Una vez que había pasado este grupo de proteínas,

*El receptor se describe como nicotínico porque puede activarse con la nicotina, así como con la acetilcolina. Esto contrasta con los receptores muscarínicos para acetilcolina de las sinapsis de nervios parasimpáticos, que pueden activarse con muscarina, pero no con nicotina, y se inhiben con atropina, no con curare. El cuerpo de los fumadores se acostumbra a los altos niveles de nicotina y ellos presentan síntomas de abstinencia cuando no fuman porque las neuronas postsinápticas que tienen receptores nicotínicos para acetilcolina ya no reciben el nivel de estímulo habitual. Estudios recientes han arrojado considerable luz sobre la relación entre la estructura del nAChR y la adicción a la nicotina (véase *Science* 306:983, 2004 y *Nature Rev. Neurosci.* 5:55, 2004.)

se pasó una solución de flaxedilo 10^{-3} M por la columna, con lo cual se eliminó de manera selectiva el nAChR de las cuentas y dejó la AChE. Con este procedimiento el receptor para acetilcolina medido mediante la unión con bungarotoxina se purificó más de 150 veces en un solo paso. Este tipo de procedimiento se conoce como *cromatografía por afinidad* y su aplicación general se describe en la sección 18.7.

El siguiente paso era identificar algo sobre la estructura del receptor para acetilcolina. Los estudios en el laboratorio de Arthur Karlin en la *Columbia University* determinaron que el nAChR es un pentámero, una proteína consistente en cinco subunidades. Cada receptor contenía dos copias de una subunidad llamada alfa y una copia de las subunidades beta, gamma y delta. Las subunidades podían distinguirse mediante la extracción de las proteínas de membrana en Triton X-100, purificación del nAChR mediante cromatografía por afinidad para luego someter la proteína purificada a electroforesis a través de un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, como se explica en la sección 18.7), con lo cual se separan los polipéptidos individuales de acuerdo con su tamaño (fig. 3).[6] Las cuatro subunidades diferentes resultaron homólogas entre sí, cada subunidad contenía cuatro hélices transmembranosas homólogas (M1 a M4).

Otro hito en el estudio del nAChR fue la demostración de que el receptor purificado actuaba como sitio para unión con ACh y también como canal para el paso de cationes. Años antes de esto, Jean-Pierre Changeux del *Instituto Pasteur* en París había postulado que la unión de acetilcolina con su receptor producía un cambio en la conformación que abría un canal iónico dentro de la proteína. La entrada de iones Na^+ a través del canal podía entonces iniciar la despolarización de la membrana y la activación de la célula muscular. Durante la segunda mitad del decenio de 1970, Changeux y colaboradores tuvieron éxito al incorporar moléculas purificadas del nAChR en vesículas artificiales de lípidos.[7] Con el uso de vesículas que contenían distintas concentraciones de iones sodio y potasio marcados, demostraron que la unión de la acetilcolina con sus receptores en la bicapa de lípidos iniciaba un flujo de cationes a través de la "membrana". Resultó evidente que la "proteína pura en realidad contiene todos los elementos estructurales necesarios para la transmisión química de una señal eléctrica, es decir, un sitio para unión con la acetilcolina, un canal iónico y un mecanismo para unir su actividad".

Durante las últimas dos décadas, los investigadores se han enfocado en la identificación de la estructura del nAChR y el mecanismo por el cual la unión con la acetilcolina induce la abertura de la compuerta iónica. El análisis de la estructura tomó distintas vías. En un método, los científicos usaron genes purificados, identificación de las secuencias de aminoácidos y mutagénesis dirigida a sitios para identificar las partes específicas de los polipéptidos que cruzan la membrana, o que se unen con el neurotransmisor o que forman el canal iónico. Estos estudios no cristalográficos sobre la anatomía molecular de una proteína tienen principios similares a los descritos en la sección 4.4.

Otra vía necesita un microscopio electrónico. Los primeros vistazos del nAChR se obtuvieron en micrografías electrónicas de las membranas de órganos eléctricos (fig. 4).[8] Los receptores parecían tener forma anular, con un diámetro de 8 nm y un canal central de 2 nm de diámetro y sobresalían de la bicapa de lípidos hacia el espacio externo. Nigel Unwin y colaboradores del *Medical Research Council of England*[9–13] desarrollaron un modelo cada vez más detallado del nAChR. Con la técnica de la cristalografía electrónica (sección 18.8), que implica un análisis matemático de las micrografías electrónicas de membranas congeladas de los órganos eléctricos, Unwin pudo analizar la estructura del nAChR en su ambiente lípido nativo. Describió la disposición de las cinco subunidades alrededor de un canal central (fig. 5). El canal iónico consiste en un poro estrecho recubierto por la pared compuesta de cinco hélices alfa internas (M2), una de cada una de las subunidades circundantes. Se ha postulado que la compuerta del poro está cerca del centro de la membrana, donde cada una de las hélices alfa M2 se flexiona hacia dentro (en el vértice de las barras con forma en V de la figura 5*a*) para formar un acodamiento en el receptor desactivado.

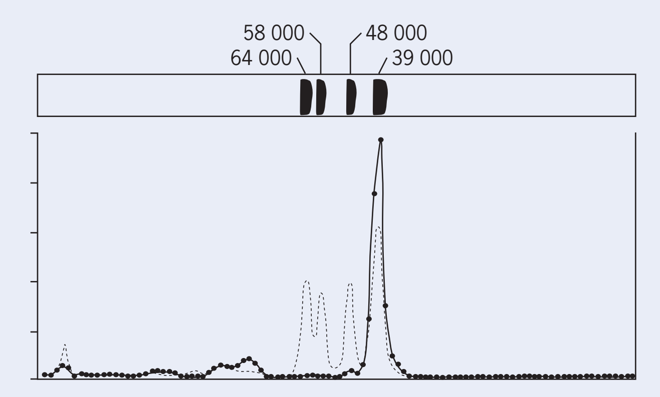


FIGURA 3 La porción superior de la figura muestra un gel SDS-poliacrilamida después de la electroforesis de una preparación del nAChR purificado. El receptor consiste en cuatro diferentes subunidades cuyos pesos moleculares se indican. Antes de la electroforesis, la preparación de receptor purificado se incubó con un compuesto radiactivo (^{3}H-MBTA) que se parece a la acetilcolina y se une con el sitio de unión para acetilcolina del nAChR. Después de la electroforesis, el gel se rebanó en cortes de 1 mm y se midió la radiactividad de cada uno. Toda la radiactividad estaba unida con la subunidad de 39 000 daltones, lo que indica que esta subunidad contiene el sitio de unión para acetilcolina. La línea punteada señala la absorbancia de luz de cada fracción, lo cual proporciona una medida de la cantidad total de proteína presente en esa fracción. Las alturas de los picos aportan una medida de las cantidades relativas de cada subunidad de la proteína. Todas las subunidades están presentes en cantidades iguales, excepto la subunidad más pequeña (subunidad alfa, que contiene el sitio de unión para acetilcolina), que está presente en una cantidad doble de copias. (Tomada de C. L. Weill, M. G. McNamee y A. Karlin, Biochem Biophys Res Commun 61:1002, 1974.)

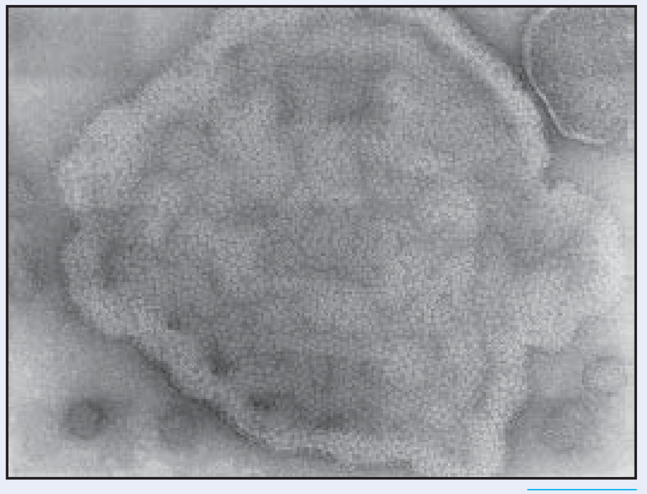


FIGURA 4 Micrografía electrónica de membranas ricas en receptores con tinción en negativo del órgano eléctrico de un pez eléctrico que muestra la densidad de moléculas de nAChR. Cada molécula de receptor es un pequeño círculo blanquecino con un diminuto punto negro en el centro; el punto corresponde al canal central, que acumuló la tinción electrodensa. (Tomada de Werner Schiebler y Ferdinand Hucho, Eur J Biochem 85:58, 1978.)

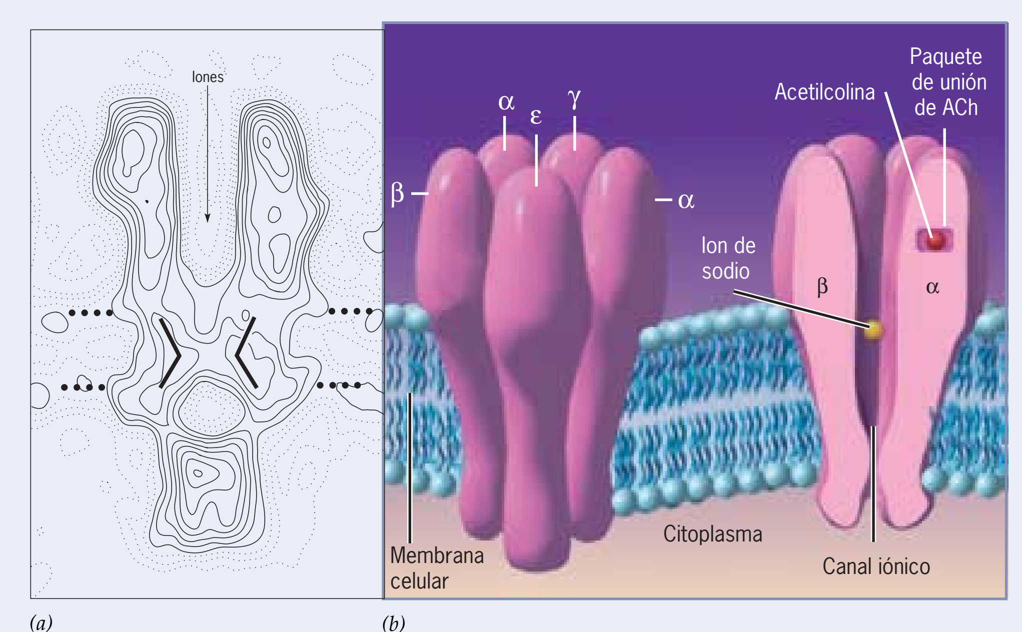


FIGURA 5 *a*) Un mapa de densidad electrónica de una rebanada que pasa por el nAChR obtenido mediante el análisis de micrografías electrónicas de cristales tubulares de membranas de *Torpedo* incrustadas en hielo. Estos análisis permitieron a los investigadores reconstruir la apariencia tridimensional de una sola proteína de nAChR que se encuentra dentro de la membrana. Los contornos continuos indican líneas de densidad similar mayor a la del agua. Las dos líneas oscuras en forma de barra representan las hélices alfa que recubren el canal en su punto más estrecho. *b*) Esquema del nAChR que muestra la disposición de las subunidades y una representación transversal de la proteína. Cada una de las cinco subunidades contiene cuatro hélices que cruzan la membrana (M1-M4). De éstas sólo la hélice interna (M2) recubre el poro y es el tema del resto de la discusión. (*A*, TOMADA DE N. UNWIN, J MOL BIOL 229:1118, 1993; © 1993, CON AUTORIZACIÓN DEL EDITOR ACADEMIC PRESS, ELSEVIER SCIENCE.)

La cadena lateral de un residuo de leucina se proyecta hacia el interior desde cada acodamiento. En este modelo, los residuos de leucina de las cinco hélices internas formarían un anillo hidrófobo estrecho que impide el cruce de iones por la membrana. La compuerta se abre después de la unión de dos moléculas de acetilcolina, una por cada subunidad alfa. Cada ACh se une a un sitio localizado dentro de un saco de una subunidad alfa (fig. 5*b*).

Para estudiar los cambios en el nAChR durante la abertura del canal, Unwin realizó el experimento siguiente.[11] Se aplicaron preparaciones de membranas ricas en nAChR a una rejilla de soporte que luego se permitió caer en un baño de etano líquido enfriado con nitrógeno para congelar las membranas. Unos cinco milisegundos antes de llegar a la superficie del baño congelante, las rejillas se rociaron con una solución de acetilcolina, la cual se unió con los receptores e inició el cambio en la conformación necesario para abrir el canal. Al comparar las micrografías electrónicas de los nAChR atrapados en el estado abierto contra el cerrado, Unwin encontró que la unión de la acetilcolina desencadena un ligero cambio en la conformación en los dominios extracelulares de las subunidades del receptor cerca de los dos sitios de unión para ACh. Conforme al modelo que se presenta en la figura 6, este cambio conformacional se propaga por la proteína, causando una pequeña rotación (15°) de las hélices M2 que recubren el poro de conducción iónica. La rotación de estas hélices internas rompe el puente hidrófobo, lo cual permite el ingreso de iones Na^+ en la célula. En las referencias 12 a 14 pueden encontrarse análisis detallados de la estructura del nAChR con resolución cada vez mayor y el mecanismo de puenteo iónico.

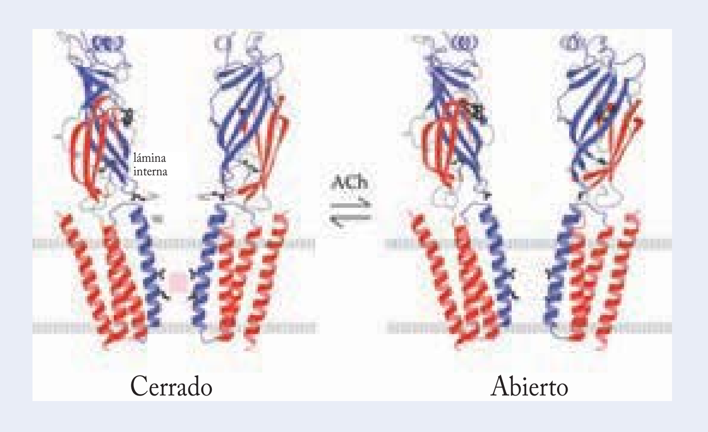


FIGURA 6 **Diagramas de cinta que ilustran los cambios propuestos que ocurren dentro del nAChR al unirse a acetilcolina.** Sólo se muestran las dos subunidades α del receptor. En el estado cerrado (izquierda), el poro está bloqueado (segmento color rosa) por la aposición estrecha de un anillo de residuos hidrófobos (las cadenas laterales valina y leucina de estos residuos en la subunidad α se indican mediante los pequeños modelos de esferas y barras en el sitio de la constricción del poro). El diámetro del poro en su punto más estrecho es de unos 6 Å, que no es suficiente para que pase un ion Na^+ hidratado. Aunque es suficientemente amplio para dejar pasar un ion Na^+ deshidratado, la pared del canal carece de los grupos polares que se requerirían para sustituir la capa desplazada de moléculas de agua (como ocurre en el filtro de selectividad del canal de K^+, figura 4-38). Una cadena lateral triptófano en los dominios citoplásmicos de las subunidades indica el sitio aproximado de la unión de acetilcolina. Después de la unión de ligando a cada dominio citoplásmico (que según se observa consta en mayor medida de láminas plegadas β), se propone un cambio conformacional, que causa una pequeña rotación de las láminas β internas en el dominio citoplásmico (flechas curvas en la figura de la izquierda). Esto, a su vez, induce un movimiento rotacional de las hélices transmembranosas internas de las subunidades, lo cual amplía el diámetro del poro, lo que permite el flujo de iones Na^+ a través del estado abierto del canal (derecha). Las partes móviles relevantes se muestran en azul. (TOMADA DE N. UNWIN, FEBS LETT. 555:94, 2003, COPYRIGHT 2003, CON AUTORIZACIÓN DE ELSEVIER SCIENCE.)

Referencias

1. Langley, J. N. 1906. On nerve endings and on special excitable substances in cells. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.* 78:170–194.
2. Loewi, O. 1921. Uber humorale ubertragbarkeit der herznervenwirkung. *Pfluger's Arch.* 214:239–242. (Un análisis del trabajo de Loewi escrito en inglés por él, se puede encontrar en *Harvey Lect*. 28:218–233, 1933.)
3. Marnay, A. 1937. Cholinesterase dans l'organe électrique de la torpille. *Compte Rend*. 126:573–574. (Un análisis del trabajo de Nachmansohm escrito en inglés, se puede encontrar en su libro, *Chemical and Molecular Basis of Nerve Action*, 2nd ed., Academic Press, 1975.)
4. Chang, C. C. & Lee, C.-Y. 1963. Isolation of the neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 144:241–257.
5. Olsen, R. W., Meunier, J. C., & Changeux, J. P. 1972. Progress in the purification of the cholinergic receptor protein from *Electrophorus electricus* by affinity chromatography. *FEBS Lett*. 28:96–100.
6. Weill, C. L., McNamee, M. G., & Karlin, A. 1974. Affinity- labeling of purified acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61:997–1003.
7. Popot, J. L., Cartaud, J., & Changeux, J.-P. 1981. Reconstitution of a functional acetylcholine receptor. *Eur. J. Biochem.* 118:203–214.
8. Schiebler, W. & Hucho, F. 1978. Membranes rich in acetylcholine receptor: Characterization and reconstitution to excitable membranes from exogenous lipids. *Eur. J. Biochem.* 85:55–63.
9. Brisson, A. & Unwin, N. 1984. Tubular crystals of acetylcholine receptor. *J. Cell Biol.* 99:1202–1211.
10. Unwin, N. 1993. Acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 229:1101–1124.
11. Unwin, N. 1995. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* 373:37–43.
12. Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y. & Unwin, N. 2003. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423: 949–955.
13. Unwin, N. 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 346:967-989.
14. Czajkowski, C. 2005. Triggers for channel opening. Nature 438: 167-168.

SINOPSIS

Las membranas plasmáticas son estructuras muy delgadas y delicadas, pero tienen un papel clave en muchas de las funciones más importantes de las células. La membrana plasmática separa a la célula viva de su ambiente; constituye una barrera de permeabilidad selectiva que permite el intercambio de ciertas sustancias al tiempo que previene el paso de otras; contiene los mecanismos para transportar las sustancias de un lado al otro de la membrana; aloja los receptores que se unen con ligandos específicos en el espacio externo y transmiten información a los compartimientos internos de la célula; media las interacciones con otras células; proporciona un marco en el que pueden organizarse los componentes; es un sitio en el que la energía se traduce de un tipo a otro (pág. 120).

Las membranas son estructuras de lípidos y proteínas en las que los componentes se mantienen unidos en una hoja delgada mediante enlaces no covalentes. La membrana se mantiene unida como una hoja cohesiva por una bicapa de lípidos consistente en una capa bimolecular de lípidos anfipáticos, cuyos grupos cabeza polares se dirigen hacia fuera y las colas acilo grasas hidrófobas se dirigen hacia el interior. Entre los lípidos se incluyen fosfoglicéridos como la fosfatidilcolina; lípidos con base de esfingosina como el fosfolípido esfingomielina, y los cerebrósidos y gangliósidos que contienen carbohidratos (glucolípidos), además de colesterol. Las proteínas de la membrana pueden dividirse en tres grupos: proteínas integrales que penetran en y a través de la bicapa lipídica, con porciones expuestas en las superficies citoplásmica y extracelular de la membrana; proteínas periféricas que se localizan completas fuera de la bicapa de lípidos pero no tienen enlaces covalentes con los grupos cabeza polares de la bicapa de lípidos ni con la superficie de una proteína integral, y proteínas fijadas por lípidos que están fuera de la bicapa lipídica, pero tienen enlaces covalentes con lípidos que forman parte de la bicapa. Los segmentos transmembranosos de las proteínas integrales casi siempre se encuentran como una hélice alfa, compuesta sobre todo por residuos hidrófobos (pág. 125).

Las membranas son estructuras muy asimétricas cuyas dos hojas tienen propiedades muy diferentes. Como ejemplos, todas las cadenas de carbohidrato de la membrana se dirigen en sentido contrario al citosol; muchas de las proteínas integrales tienen sitios en su superficie externa que interactúan con ligandos extracelulares y sitios en su superficie interna que interactúan con proteínas periféricas y forman parte de un esqueleto de la membrana interna; además, el contenido de fosfolípidos de las dos mitades de la bicapa es muy asimétrico. La mejor forma de revelar la organización de las proteínas dentro de la membrana es en réplicas congeladas y fracturadas en las que se congelan las células, se dividen sus membranas por el centro de la bicapa por un plano de fractura y se visualizan las caras internas expuestas mediante la formación de una réplica en metal (pág. 140).

El estado físico de la bicapa lipídica tiene importantes consecuencias para la movilidad lateral de los fosfolípidos y las proteínas integrales. La viscosidad de la bicapa y la temperatura en la cual sufre la transición de fase dependen del grado de insaturación y la longitud de las cadenas acilo grasas de los fosfolípidos. El mantenimiento de una membrana fluida es importante para muchas actividades celulares, como la transducción de señales, división celular y formación de regiones especializadas de membrana. Al principio, la difusión lateral de las proteínas dentro de la membrana se demostró por fusión celular y puede cuantificarse con técnicas que siguen los movimientos de las proteínas marcadas con compuestos fluorescentes o marcadores electrodensos. La medición de los coeficientes de difusión de las proteínas integrales sugiere que la mayoría está sujeta a influencias restrictivas que inhiben su movilidad. Las proteínas pueden estar limitadas por su relación con otras proteínas integrales o con proteínas periféricas localizadas en la superficie de la membrana. A causa de estos diversos tipos de restricciones, las membranas alcanzan una considerable medida de estabilidad organizacional en la que se diferencian entre sí las regiones particulares de membrana (pág. 136).

La membrana plasmática del eritrocito contiene dos proteínas integrales principales, la banda 3 y la glucoforina A, así como un esqueleto interno bien definido compuesto de proteínas periféricas. Cada subunidad de banda 3 abarca toda la membrana por lo menos una docena de veces y contiene un canal interno por el cual se intercambian aniones bicarbonato y cloro. La glucoforina A es una proteína muy glucosilada con función incierta que contiene un solo dominio transmembranoso consistente en una hélice alfa hidrófoba. El principal componente del

esqueleto de la membrana es la proteína fibrosa espectrina, que interactúa con otras proteínas periféricas para suministrar soporte a la membrana y limitar la difusión de sus proteínas integrales (pág. 144).

La membrana plasmática es una barrera con permeabilidad selectiva que permite el paso de solutos por varios mecanismos, entre ellos la difusión simple a través de la bicapa lipídica o canales en la membrana, difusión facilitada y transporte activo. La difusión es un proceso independiente de energía donde un soluto se mueve en favor de un gradiente electroquímico, lo que disipa la energía libre almacenada en el gradiente. Los solutos inorgánicos pequeños, como el O_2, CO_2 y H_2O, penetran con facilidad la bicapa de lípidos, al igual que los solutos con coeficientes de partición altos (alta solubilidad en lípidos). Los iones y los solutos orgánicos polares, como los azúcares y los aminoácidos, requieren transportadores especiales para entrar o salir de la célula. (pág. 147).

El agua se mueve por ósmosis a través de la membrana plasmática semipermeable de una región con menor concentración de solutos (el compartimiento hipotónico) a una región con mayor concentración de soluto (el compartimiento hipertónico). La ósmosis tiene un papel clave en múltiples funciones celulares. Por ejemplo, en las plantas la entrada de agua genera presión de turgencia contra la pared celular que ayuda a sostener los tejidos no leñosos (pág. 149).

Los iones se difunden a través de la membrana plasmática mediante canales especiales recubiertos con proteína que a menudo son específicos para iones particulares. Los canales iónicos casi siempre tienen una compuerta que se controla por voltaje o ligandos químicos, como los neurotransmisores. El análisis de un canal iónico bacteriano (KcsA) reveló cómo los átomos de oxígeno que fluyen de la columna vertebral del polipéptido son capaces de sustituir a las moléculas de agua que habitualmente se relacionan con iones K^+, lo que permite que la proteína conduzca en forma selectiva iones K^+ a través de su canal central. Los canales de K^+ activados por voltaje contienen un segmento helicoidal cargado que se mueve como respuesta al voltaje de la membrana, lo cual abre o cierra la compuerta (pág. 150).

La difusión facilitada y el transporte activo requieren la participación de las proteínas integrales de la membrana que se combinan en forma específica con el soluto que se transporta. Los transportadores facilitadores actúan sin gasto de energía y mueven solutos en favor del gradiente de concentración en ambas direcciones a través de la membrana. Se cree que actúan mediante el cambio en la conformación, lo cual expone el sitio de unión con soluto a ambos lados de la membrana en forma alternada. El transportador de glucosa es un transportador facilitador cuya presencia en la membrana plasmática se estimula por los niveles altos de insulina. Los transportadores activos requieren el gasto de energía y mueven iones y solutos en contra del gradiente de concentración. Los transportadores activos tipo P, como la ATP-asa de Na^+/K^+, funcionan con el impulso de la transferencia de un grupo fosfato del ATP al transportador, lo que cambia su afinidad por el ion transportado. Los sistemas de transporte activo secundario derivan la energía almacenada en un gradiente iónico para transportar un segundo soluto contra un gradiente de concentración. Por ejemplo, el transporte activo de la glucosa a través de la superficie apical de la célula epitelial intestinal se impulsa por el cotransporte de Na^+ en favor de su gradiente electroquímico (pág. 156).

El potencial de reposo a través de la membrana plasmática se debe sobre todo a la permeabilidad limitada de la membrana al K^+ y está sujeta a cambios drásticos. El potencial de reposo de una célula nerviosa o muscular típica es cercano a –70 mV (interior negativo). Cuando la membrana de una célula excitable se despolariza más allá del valor umbral, se inician los fenómenos que conducen a la abertura de los canales del Na^+ y la entrada de sodio, lo cual se mide como una inversión en el voltaje a través de la membrana. Unos milisegundos después de abrirse, las compuertas para el Na^+ se cierran y los canales del potasio se abren, lo cual posibilita la salida de K^+ con la restauración del potencial de reposo. La serie de cambios drásticos en el potencial de membrana después de la despolarización constituye un potencial de acción (pág. 163).

Una vez que el potencial de acción se inició, se propaga por sí mismo. Los potenciales de acción se propagan porque la despolarización que acompaña al potencial de acción en un sitio de la membrana es suficiente para despolarizar la membrana adyacente, lo cual inicia un potencial de acción en ese sitio. En un axón mielinizado, un potencial de acción en un nodo de la vaina puede despolarizar la membrana del siguiente nodo, lo que permite que el potencial de acción salte con rapidez de un nodo a otro. Cuando el potencial de acción llega a los botones terminales de un axón, se abren las compuertas de calcio en la membrana plasmática, lo que permite la entrada de Ca^{2+}, que inicia la fusión de las membranas de las vesículas secretoras que contienen los neurotransmisores con la membrana plasmática suprayacente. El neurotransmisor se difunde a través de la hendidura sináptica y se une con los receptores de la membrana postsináptica, lo que induce despolarización o hiperpolarización de la célula blanco (pág. 166).

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. ¿Qué tipo de proteínas integrales esperaría que hubiera en la membrana plasmática de una célula epitelial que están ausentes en un eritrocito?, ¿cómo se relacionan estas diferencias con las actividades de estas células?
2. Muchos tipos diferentes de células tienen receptores que se unen con hormonas esteroideas. ¿En qué partes de la célula esperaría usted que estuvieran estos receptores y el receptor para insulina?, ¿por qué?
3. Cuando se informó por primera vez sobre la apariencia trilaminar de la membrana plasmática, las imágenes se tomaron como evidencia para apoyar el modelo de Davson-Danielli de la estructura plasmática. ¿Por qué cree que estas micrografías pudieron interpretarse de esta forma?
4. Suponga que planea usar liposomas como intento para llevar fármacos a un tipo particular de célula en el cuerpo, por ejemplo, adipocito o célula muscular. ¿Hay alguna forma en que pudiera construir el liposoma para aumentar su especificidad por el blanco?
5. ¿Cómo es que, a diferencia de polisacáridos como el almidón y el glucógeno, los oligosacáridos de la superficie de la membrana plasmática pueden participar en interacciones específicas?, ¿cómo se ilustra esta característica al identificar el tipo sanguíneo de una persona antes de aplicar una transfusión?
6. La tripsina es una enzima que digiere las porciones hidrofílicas de las proteínas de membrana, pero es incapaz de penetrar la bicapa lipídica y entrar a la célula. A causa de estas propiedades,

la tripsina se ha usado junto con SDS-PAGE para establecer cuáles proteínas tienen un dominio extracelular. Describa un experimento que utilice tripsina para establecer la lateralidad de las proteínas de la membrana de un eritrocito.

7. Observe la micrografía electrónica de los eritrocitos en la figura 4-31*a*. Se dice que estas células, que son aplanadas y tienen depresiones circulares a ambos lados, son bicóncavas. ¿Cuál es la ventaja fisiológica de un eritrocito bicóncavo en comparación con una célula esférica?

8. Suponga que cultiva una población de bacterias a 15°C y luego eleva la temperatura del cultivo a 37°C. ¿Qué efecto cree que podría tener esto en la composición de ácidos grasos de la membrana?, ¿y en la temperatura de transición de la bicapa lipídica?, ¿y en la actividad de las desaturasas de la membrana?

9. Al observar la figura 4-6, ¿qué lípidos esperaría que tuvieran la mayor velocidad de "voltereta"?, ¿y la menor?, ¿por qué? Si de manera experimental encontrara que la fosfatidilcolina en realidad tiene la mayor velocidad de giro, ¿cómo podría explicar este hallazgo?, ¿cómo esperaría que fuera la velocidad de giro de un fosfolípido en comparación con la de una proteína integral?, ¿por qué?

10. ¿Cuál es la diferencia entre una representación bidimensional y una tridimensional de una proteína de membrana?, ¿cómo se obtienen los diferentes tipos de perfiles y cuál es más útil?, ¿por qué cree que hay tantas proteínas con estructura bidimensional conocida?

11. Si fuera a inyectar un axón de calamar gigante con un volumen diminuto de solución que contuviera 0.1 M de NaCl y 0.1 M de KCl en que tanto los iones Na^+ como K^+ tuvieran marca radiactiva, ¿cuál de los iones radiactivos esperaría que apareciera con mayor rapidez dentro del medio de agua salada mientras la neurona permaneciera en reposo?, ¿y después que se estimulara la neurona para conducir varios potenciales de acción?

12. Ha sido difícil aislar proteínas que contienen canales para agua (acuaporinas) debido a la gran velocidad de difusión del agua a través de la membrana lipídica. ¿Por qué dificultaría esto el aislamiento de la acuaporina?, ¿hay alguna forma en que pudiera distinguir la difusión del agua por la bicapa lipídica contra la que ocurre por las acuaporinas? La mejor forma de estudiar el comportamiento de la acuaporina ha sido expresar los genes de acuaporina en ovocitos de rana. ¿Hay alguna razón por la que los ovocitos de un anfibio que vive en estanques pudieran ser tan adecuados para estos estudios?

13. ¿Cómo es que los coeficientes de difusión medidos para los lípidos dentro de las membranas tienden a estar más cerca de lo esperado para la difusión libre que los medidos para las proteínas integrales en las mismas membranas?

14. Asuma que la membrana plasmática de una célula de pronto se vuelve permeable en la misma medida tanto al sodio como al potasio y que ambos iones estaban presentes con un gradiente de concentración de la misma magnitud. ¿Esperaría que estos dos iones cruzaran la membrana con la misma velocidad?, ¿por qué?

15. La mayoría de los invertebrados marinos no pierde ni gana agua por ósmosis, mientras que la mayor parte de los vertebrados marinos tiene una pérdida continua de agua en su ambiente rico en sal. Con base en esta diferencia conjeture cómo podrían reflejarse las diferentes vías de evolución en los dos grupos.

16. ¿Cómo esperaría que las concentraciones de soluto dentro de una célula vegetal se compararan con las de los líquidos extracelulares?, ¿esperaría que ocurriera lo mismo con las células de un animal?

17. ¿Cuál sería la consecuencia de la conducción de un impulso si los canales del Na^+ pudieran reabrirse de inmediato después de cerrarse durante un potencial de acción?

18. ¿Cuál sería el valor del potencial de equilibrio del potasio si la concentración externa de K^+ fuera de 200 mM y la interna de 10 mM a 25°C?, ¿y a 37°C?

19. Como se explica en la página 163, el cotransportador de Na^+/glucosa transporta dos iones Na^+ por cada molécula de glucosa. ¿Qué sucedería si la proporción fuera 1:1 en lugar de 2:1?, ¿cómo afectaría la concentración de glucosa contra la cual podría trabajar el transportador?

20. Una proteína transmembranosa casi siempre tiene las siguientes características: a) la porción que transita la bicapa de la membrana tiene por lo menos 20 aminoácidos de longitud, casi todos o todos residuos no polares; b) la porción que fija la proteína a la cara externa tiene dos o más residuos ácidos consecutivos, y c) la porción que fija la proteína a la cara citoplásmica tiene dos o más residuos básicos consecutivos. Considere la proteína transmembranosa con la siguiente secuencia:

NH_2-MLSTGVKRKGAVLLILLFPWMVAGGPLFWLAA DESTYKGS-COOH

Dibuje esta proteína como se encontraría en la membrana plasmática. Asegúrese de marcar las terminaciones N- y C-, así como las caras externa y citoplásmica de la membrana. (El código de una sola letra para aminoácidos se presenta en la fig. 2-26.)

21. Muchos invertebrados marinos, como el calamar, tienen líquidos extracelulares que se parecen al agua marina, por lo que tienen concentraciones de iones intracelulares mucho más altas que los mamíferos. Para una neurona de calamar, las concentraciones iónicas son:

Ion	*Concentración intracelular*	*Concentración extracelular*
K^+	410 mM	15 mM
Na^+	40 mM	440 mM
Cl^-	100 mM	560 mM
Ca^{2+}	2×10^{-4} mM	10 mM
pH	7.6	8.0

Si el potencial de reposo de la membrana plasmática, V_m, es –70 mV, ¿hay un ion en equilibrio?, ¿qué tan lejos del equilibrio, en mV, está cada ion?, ¿cuál es la dirección del movimiento neto de cada ion a través de un canal abierto permeable a ese ion?

22. El potencial de membrana de una célula depende de la permeabilidad relativa de la membrana a los diversos iones. Cuando la acetilcolina se une con sus receptores en la membrana muscular postsináptica, causa la abertura masiva de los canales que tienen la misma permeabilidad al sodio y potasio. En estas condiciones:

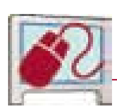
$$V_m = (V_{K^+} + V_{Na^+})/2$$

Si $[K^+_{in}] = 140$ mM y $[Na^+_{in}] = 10$ mM para la célula muscular y $[Na^+_{ext}] = 150$ mM y $[K^+_{ext}] = 5$ mM, ¿cuál es el potencial de membrana de la unión neuromuscular de un músculo estimulado por acetilcolina?

23. Los dominios transmembranosos consisten en hélices alfa individuales o una hoja beta dispuesta en forma de barril. Al mirar las figuras 2-30 y 2-31, ¿por qué una sola hélice alfa es más adecuada para cruzar la bicapa que una sola cadena beta?

24. El conocimiento de que el canal del K^+ selecciona los iones de K^+ sugiere un mecanismo por el cual el canal del Na^+ es capaz de seleccionar este ion.

25. ¿Cómo compararía la velocidad de movimiento de iones que pasan a través de un canal con la velocidad de los transportados en forma activa por una bomba tipo P?, ¿por qué?



SITIO EN INTERNET www.wiley.com/college/karp

Las animaciones y los videos indicados en este capítulo pueden visitarse en el sitio de Cell and Molecular Biology de Karp en Internet. También hallará todas las respuestas a las preguntas analíticas recién planteadas, autoexámenes que le ayudarán a prepararse para los exámenes, y vínculos con fascinantes recursos. La sección lecturas adicionales que sigue se amplía en el sitio en Internet.

LECTURAS ADICIONALES

Membranas: estructura y función

Abbott, A. 2005. Hopping fences. *Nature* 433:680–682. [movilidad de los lípidos].

Allen,T.M.& Cullis, P. R. 2003.Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* 303:1818–1822. [liposomas.]

Bowie, J. U. 2005. Solving the membrane protein folding problem. *Nature* 438:581–589.

Edidin, M. 2003. Lipids on the frontier: a century of cell membrane bilayers. *Nature Revs. MCB* 4:414–418.

Feizi, T. & Chai, W. 2004. Oligosaccharide microarrays to decipher the glyco code. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 5:582–588.

Fleishman, S. J. et al. 2006. Transmembrane protein structures without X-rays. *Trends Biochem. Sci.* 31:106–113.

Lin, J. & Shaw, A. S. 2005. Getting downstream without a raft. *Cell* 121:815–816.

Munro, S. 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115:377–388.

Nichols, B. 2005.Without a raft. *Nature* 436:638–639.

Popot, J.-L. & Engelman, D. M. 2000. Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Annu. Rev. Biochem.* 69:881–922.

Proia, R. L. 2004. Gangliosides help stabilize the brain. *Nature Gen.* 36:1147–1148.

Singer, S. J. 2004. Some early history of membrane molecular biology. *Annu. Rev. Physiol*. 66:1–27.

Stein, K. K., et al. 2004. Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. *J. Cell Sci.* 117:6269–6274.

Wells, W. A. 2005. The invention of freeze-fracture EM and the determination of membrane structure. *J. Cell Biol.* 168:174–175.

Zimmerberg, J. 2006. Membrane biophysics. *Curr. Biol.* 16:R272–R276.

Canales membranosos y enfermedad

Ashcroft, F. M., et al. 2006. Reviews on ion channels. *Nature* 440:439–489.

Benzanilla, F. 2005.The voltage-sensor structure in a voltage-gated channel. *Trends Biochem. Sci*. 30:166-169.

Clapham, D. E. 2003. Symmetry, selectivity, and the 2003 Nobel Prize. *Cell* 115:641–646.

de Groot, B. L. & Grubmüller, H. 2005. The dynamics and energetics of water permeation and proton exclusion in aquaporins. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 15:176–183.

Driskell, R. A. & Engelhardt, J. F. 2003. Current status of gene therapy for inherited lung diseases. *Annu. Rev. Physiol*. 65:585–612.

Facciotti, M.T., et al. 2004. Energy transduction in transmembrane ion pumps. *Trends Biochem. Sci.* 29:445–451.

Gouaux, E. & Mackinnon, R. A. 2005. Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science* 310:1461–1465.

Gray, M. A. 2004. Bicarbonate secretion: it takes two to tango. *Nature Cell Biol*. 6:292–294. [fibrosis quística.]

Hille, B. 2001. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed. Sinauer.

Hille, B., Armstrong, C. M., & Mackinnon, R. 1999. Ion channels: From idea to reality. *Nature Med*. 5:1105–1109.

Horn, R. 2005. How ion channels sense membrane potential. *PNAS* 102:4929–4930.

Jackson, M. B., et al. 2004. 9 articles on advances in ion channel structure. *Trends Neurosci*. vol. 27, #6.

Jentsch,T. J. et al. 2004. Ion channels: function unravelled by dysfunction. *Nature Cell Biol*. 6:1039–1047.

King, L. S., et al. 2004. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 5:687–698.

Kühlbrandt, W. 2000. Bacteriorhodopsin—the movie. *Nature* 406:569–570.

Lancaster, C. R. D. 2004. Ion pump in the movies. *Nature* 432:286–287. [bomba de Ca^{2+}.]

Miller, C. 2003. Ion channels go to Stockholm—this time as proteins. *Neuron* 40:1049–1051.

Papazian, D. 2004. BK channels: the spring between senor and gate. *Neuron* 42:699–701.

Quinton, P. M. 2001. The neglected ion: HCO_3^-. *Nature Med*. 7:292–293. [fibrosis quística.]

Roux, B. & Schulten, K. 2004. Computational studies of membrane channels. *Structure* 12:1343–1351.

Rowe, S. M., et al. 2005. Cystic fibrosis. *New Engl. J. Med.* 352:1992–2001.

Sands, Z., et al. 2005. Voltage-gated ion channels. *Curr. Biol.* 15: R44–R47.

Sansom, M. S. P. & Law, R. J. 2001. Aquaporins—channels without ions. *Curr. Biol.* 11:R71=R73.

Service, R. F. 2005. A new portrait puts potassium pore in a fresh light. *Science* 309:867.

Impulsos nerviosos y transmisión sináptica

Hall, Z. W. 1992. *An Introduction to Molecular Neurobiology.* Sinauer.

Hyman, S. E. 2005.Neurotransmitters. *Curr. Biol.* 15:R154–R158.

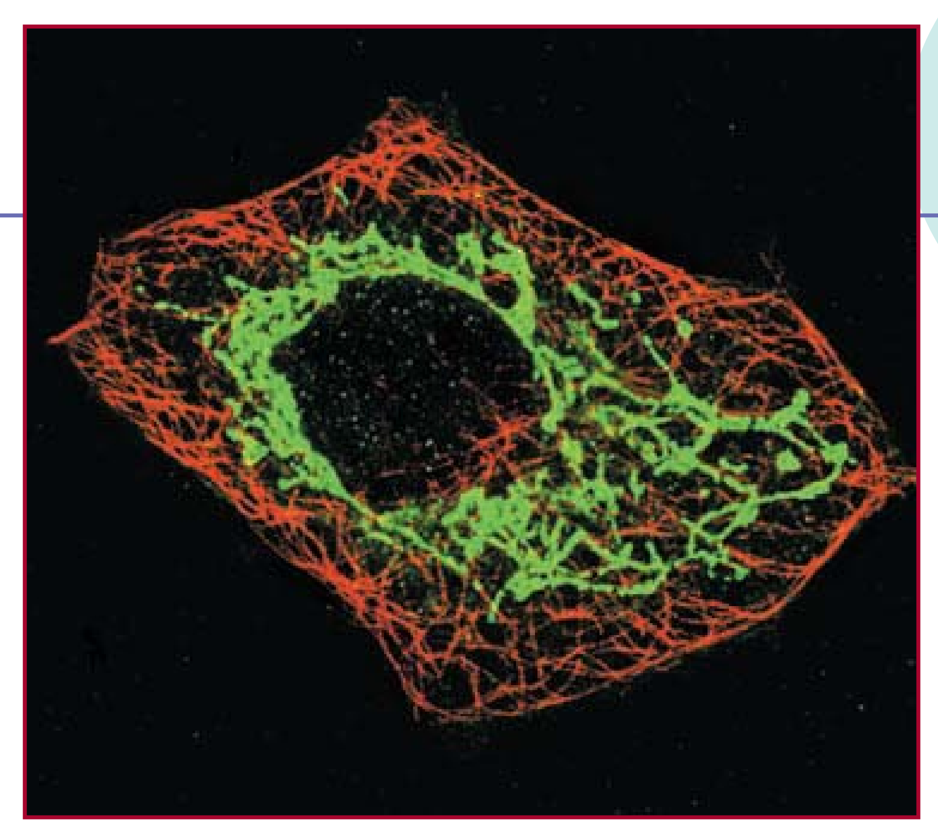
Jessell, T. M., Kandel, E. R., et al., 1993. Synaptic transmission: Nine reviews. *Cell* 72:Suppl. 1–149.

Keynes, R. D. & Aidley, D. J. 2001. *Nerve and Muscle*, 3rd ed. Cambridge.

Marx, J. 2006. Drugs inspired by a drug. *Science* 311:322-325. [endocanabinoides.]

Nicoll, R. A. & Alger, B. E. 2004. The brain's own marijuana. *Sci. Amer.* pp. 68–75. Dec.

CAPÍTULO 5

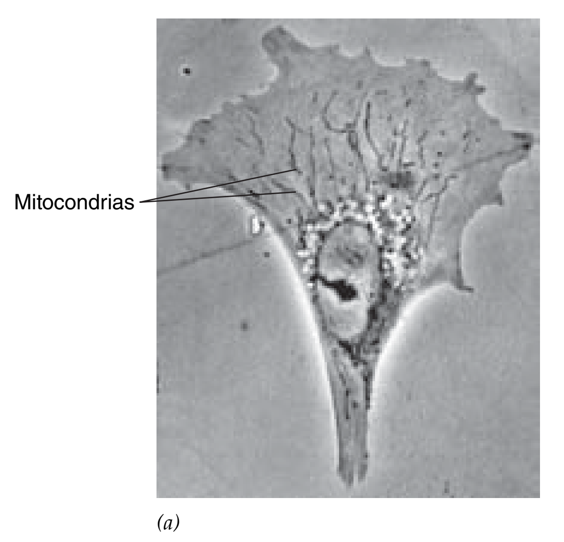


La respiración aeróbica y la mitocondria

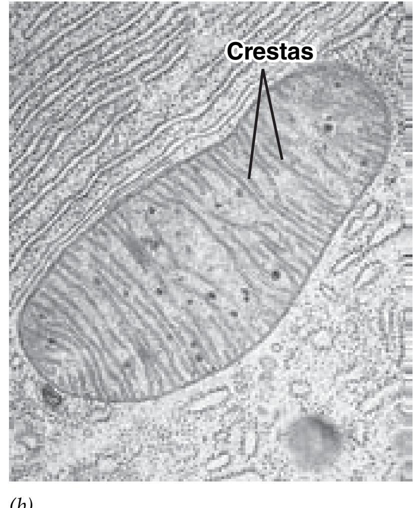
Durante los primeros 2 000 millones de años de vida en la Tierra, la atmósfera estaba formada sobre todo con moléculas reducidas, como hidrógeno molecular (H_2), amoniaco (NH_3) y H_2O. En este periodo, el planeta estaba poblado por **anaerobios**; organismos que capturaban y utilizaban energía mediante metabolismo independiente del oxígeno (anaeróbico), como la glucólisis y la fermentación (figs. 3-24 y 3-29). Después, hace unos 2 700 millones de años, aparecieron las cianobacterias, un nuevo tipo de organismo que realizaba una nueva clase de proceso fotosintético, uno en el que las moléculas de agua se dividían y se liberaba oxígeno molecular (O_2).

Como se explicó en la página 34, el oxígeno molecular puede ser una sustancia muy tóxica, capta los electrones adicionales y reacciona con diversas moléculas biológicas. La presencia de oxígeno en la atmósfera debió ser un potente agente para la selección natural. Con el tiempo evolucionaron especies que no sólo estaban protegidas de los efectos dañinos del oxígeno molecular, sino que tenían vías metabólicas que aprovechaban en buena medida esta molécula. Sin la capacidad para usar el oxígeno, los organismos sólo podían extraer una cantidad limitada de energía de sus alimentos y excretaban productos ricos en energía, como ácido láctico y etanol, que no podían metabolizar más. En cambio, los organismos que incorporaron O_2 en su metabolismo podían oxidar por completo estos compuestos hasta CO_2 y H_2O; en este proceso extraían un porcentaje mucho mayor de su contenido energético. Estos organismos que se volvieron depen-

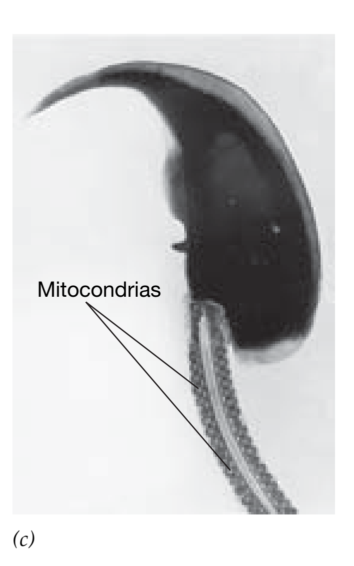
Micrografía de un fibroblasto de mamífero fijado y teñido con anticuerpos fluorescentes que revela la distribución de las mitocondrias (verde) y los microtúbulos del citoesqueleto (rojo). Las mitocondrias se ven como una red extensa o retículo que ocupa gran parte de la célula. (TOMADA DE MICHAEL P. YAFFE, UNIVERSITY OF CALIFORNIA, SAN DIEGO, REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE SCIENCE 283:1493, 1999; © 1999, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE.)



(a)



(b)



(c)

FIGURA 5-1 Mitocondrias. *a*) Fibroblasto vivo visto con un microscopio de fase de contraste. Las mitocondrias se ven como cuerpos oscuros alargados. *b*) Micrografía electrónica de transmisión de un corte delgado a través de una mitocondria que revela la estructura interna del organelo, en particular las crestas membranosas de la membrana interna. *c*) Localización de mitocondrias en la pieza central de un espermatozoide que rodea la porción proximal del flagelo. (*A*, Cortesía de Norman K. Wessels; *B*, Cortesía de K. R. Porter/Photo Researchers; *C*, Don W. Fawcett/Visuals Unlimited.)

dientes del oxígeno fueron los primeros **aerobios** de la Tierra y al final dieron origen a todos los seres procariotas y eucariotas dependientes de oxígeno que existen hoy en día. En los eucariotas, la utilización de oxígeno como medio de extracción de energía ocurre en un organelo especializado, la **mitocondria**. Como se describe en el capítulo 1, muchísimos datos indican que la mitocondria evolucionó a partir de una bacteria aerobia ancestral que fijó su residencia dentro del citoplasma de una célula hospedadora anaerobia.

5.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA MITOCONDRIA

A diferencia de la mayoría de los organelos citoplásmicos, las mitocondrias son lo bastante grandes para verse con el microscopio óptico (fig. 5-1*a*) y su presencia en las células se conoce desde hace más de 100 años. Según sea el tipo celular, las mitocondrias tienen una estructura general muy distinta. En un extremo del espectro, las mitocondrias pueden verse como organelos individuales con forma de salchicha (fig. 5-1*b*), cuyo tamaño varía entre 1 y 4 μm de largo. En el otro extremo del espectro, las mitocondrias se ven como una red tubular interconectada muy ramificada. Este tipo de estructura mitocondrial puede verse en la micrografía inicial del capítulo. Las observaciones de mitocondrias con marca fluorescente dentro de células vivas las muestran como organelos dinámicos capaces de sufrir enormes cambios en su forma. Lo más importante es que las mitocondrias pueden fusionarse entre sí o dividirse en dos (fig. 5-2). El entendimiento de la fisión y la fusión mitocondriales ha mejorado en años recientes con el desarrollo de los ensayos in vitro para su estudio y la identificación de proteínas necesarias para ambos procesos. Es probable que el equilibrio entre fusión y fisión sea un factor determinante del número y la morfología mitocondriales.

Las mitocondrias ocupan 15 a 20% del volumen de una célula hepática promedio de mamífero y contienen más de mil proteínas diferentes. A menudo las mitocondrias se relacionan con gotitas de aceite que contienen ácidos grasos a partir de las cuales obtienen materias primas para oxidar. En los esper-

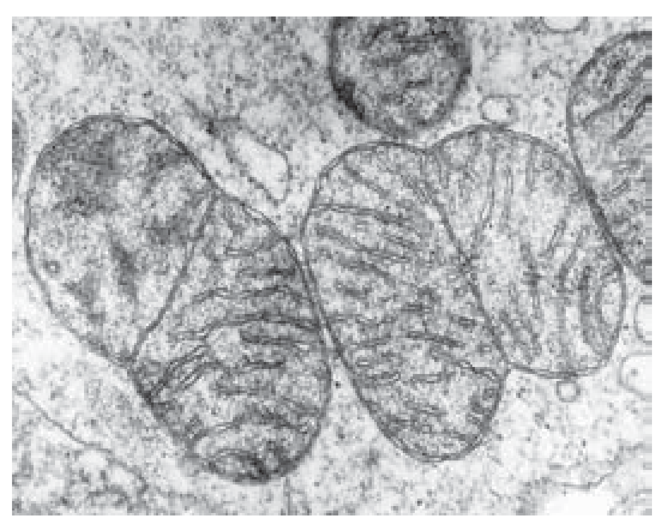
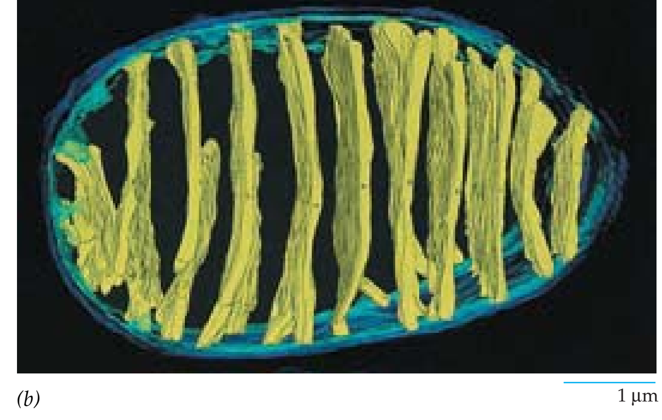


FIGURA 5-2 Fisión mitocondrial. Tal y como las membranas surgen de membranas preexistentes y las células se originan de células previas, las mitocondrias provienen de mitocondrias preexistentes mediante un proceso llamado fisión. Esta micrografía electrónica muestra dos mitocondrias de una célula de insecto en el proceso de fisión. (Tomada de W. J. Larsen, J Cell Biol 47:379, 1970, con los derechos reservados de Rockefeller University Press.)

(a)



(b)

Espacio intermembranoso
Ribosoma
Matriz
DNA
Membrana externa
Membrana de la cresta
Crestas
Membrana interna
Partículas de sintetasa de ATP

(c)

FIGURA 5-3 La estructura de una mitocondria. *a*) Micrografía electrónica de una mitocondria macerada que muestra la matriz interna rodeada por pliegues de la membrana interna. *b*) Reconstrucción tridimensional de una mitocondria con base en una serie de micrografías tomadas con un microscopio electrónico de alto voltaje de un solo corte grueso de tejido adiposo pardo que se rotó en varios ángulos. Los instrumentos de alto voltaje aceleran los electrones hasta velocidades que les permiten penetrar cortes de tejido más gruesos (de hasta 1.5 µm). Esta técnica sugiere que las crestas se encuentran como hojas aplanadas (láminas) que se comunican con el espacio intermembranoso mediante aberturas tubulares estrechas, en lugar de canales "amplios" como suele mostrarse. En esta reconstrucción, la membrana mitocondrial interna se muestra en azul en las regiones periféricas y en amarillo cuando penetra en la matriz para formar las crestas. *c*) Diagramas esquemáticos que ilustran la estructura interna tridimensional (arriba) y un corte delgado (abajo) de una mitocondria de tejido cardiaco bovino. (*A*, TOMADA DE K. TANAKA Y T. NAGURO, INT REV CYTOL 68:111, 1980; *B*, TOMADA DE G. A. PERKINS, ET AL., J BIOEN BIOMEMB 30:436, 1998.)

matozoides se observa una disposición muy impresionante de las mitocondrias; muchas veces se localizan en la porción intermedia, justo detrás del núcleo (fig. 5-1*c*). Los movimientos del espermatozoide están impulsados por el ATP producido en estas mitocondrias. Las mitocondrias también son notables en muchas células vegetales, en las que son los principales productores de ATP en los tejidos no fotosintéticos, además de ser fuente de ATP en las células de las hojas fotosintéticas durante los periodos de oscuridad.

Si se observa de cerca la micrografía electrónica de la figura 5-2, resulta evidente que el límite exterior de la mitocondria posee dos membranas, que se conocen como *membranas mitocondriales externa* e *interna*. La membrana mitocondrial externa rodea a la mitocondria completa y sirve como límite exterior. El interior del organelo contiene una serie de hojas membranosas de doble capa, llamadas **crestas**, que llegan hasta la membrana mitocondrial interna en el límite del organelo. La función de las mitocondrias como transductores de energía tiene gran relación con las membranas de las crestas que son tan prominentes en las micrografías electrónicas de estos organelos. Las crestas contienen una gran cantidad de superficie de membrana que aloja la maquinaria necesaria para la respiración aeróbica y la formación de ATP (véase fig. 5-21). La organización de las crestas se muestra en un perfil más claro en la micrografía electrónica de barrido de la figura 5-3*a* y en la reconstrucción tridimensional de la figura 5-3*b*. Hasta hace poco se pensaba que las crestas consistían en simples invaginaciones de la membrana interna. Ahora, la mayoría está de acuerdo en que la membrana limitante interna y las membranas internas de las crestas poseen funciones distintas, aunque están unidas entre sí por conexiones estrechas, como se muestra en los esquemas de la figura 5-3*c*. Para facilitar la explicación, se describen las crestas como una parte simple de la membrana mitocondrial interna en lo que resta del presente capítulo.

Las membranas de la mitocondria dividen al organelo en dos compartimientos acuosos, uno en el interior de la mitocondria, llamado **matriz**, y el segundo entre las membranas interna y externa, llamado **espacio intermembranoso**. La matriz tiene una consistencia gelatinosa por la elevada concentración (hasta 500 mg/ml) de proteínas hidrosolubles. Las proteínas del espacio intermembranoso son mejor conocidas por su participación en el inicio del suicidio celular, un tema que se analiza en la sección 15.8.

Membranas mitocondriales

Las membranas externa e interna tienen propiedades muy diferentes. Cerca de 50% del peso de la membrana externa lo constituyen los lípidos y contiene una mezcla curiosa de enzimas que participan en actividades tan diversas como la oxidación de adrenalina, la degradación del triptófano y la elongación de los ácidos grasos. En cambio, la membrana interna contiene más de 100 polipéptidos diferentes y muestra una proporción proteína/lípido muy alta (más de 3:1 por peso, lo cual corresponde a una molécula de proteína por cada 15 fosfolípidos). La membrana interna es rica en un fosfolípido inusual, la cardiolipina (difosfatidilglicerol, véase la figura 4-6 en cuanto a su estructura), lo que es una característica de las membranas plasmáticas bacterianas, de las que se presupone que evolucionó la membrana mitocondrial interna. Se cree que la membrana mitocondrial externa es homóloga de una membrana externa presente como parte de la pared celular de ciertas células bacterianas (fig. 5-4). La membrana mitocondrial externa y la membrana bacteriana externa contienen *porinas,* éstas son proteínas integrales que poseen un canal interno relativamente grande (2 a 3 nm) rodeado por un barril de cadenas beta. Las porinas de la membrana mitocondrial externa no son estructuras estáticas, como alguna vez se pensó, sino que pueden realizar un cierre reversible como respuesta a las condiciones dentro de la célula. Cuando los canales de porina están abiertos, la membrana externa es permeable a moléculas como el ATP, NAD y coenzima A, que tienen papeles clave en el metabolismo energético dentro de la mitocondria. En contraste, la membrana mitocondrial interna es impermeable; todas las moléculas e iones requieren transportadores de membrana especiales para ingresar a la matriz.

Entre las múltiples proteínas de la membrana mitocondrial interna, hay varias participantes en la captación y liberación de iones calcio. Los iones calcio son iniciadores importantes de las actividades celulares (sección 15.5), estudios recientes confirmaron la función de las mitocondrias (junto con el retículo endoplásmico) en la regulación de la concentración de Ca^{2+} en el citosol.

Como se describe en las secciones siguientes, la composición y organización de la membrana mitocondrial interna son las claves para las actividades bioenergéticas de este organelo. La configuración de la membrana interna y la aparente fluidez de su bicapa facilitan las interacciones necesarias para la síntesis de ATP.

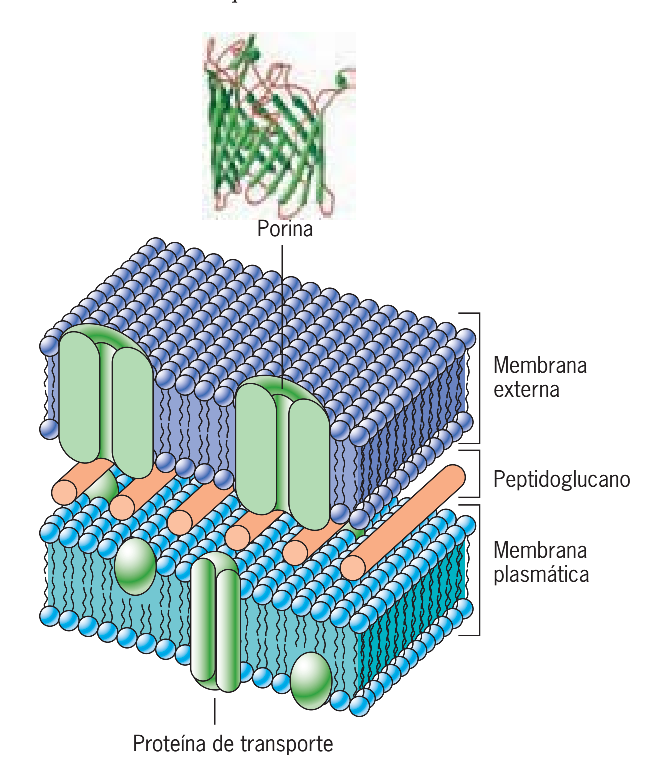


FIGURA 5-4 Porinas. Las bacterias gramnegativas poseen una membrana externa que contiene lípidos fuera de la membrana plasmática como parte de su pared celular. Esta membrana externa tiene proteínas, llamadas porinas, que consisten en un barril de una hoja beta y forman una abertura a través de la cual pueden penetrar moléculas de tamaño moderado. También se encuentran diversas porinas con canales de diferentes tamaños y selectividades en la membrana mitocondrial externa en las células eucariotas.

La matriz mitocondrial

Además de tener varias enzimas, la matriz mitocondrial contiene ribosomas (de tamaño mucho menor a los que se encuentran en el citosol) y varias moléculas de DNA, el cual es circular en plantas superiores y animales (fig. 5-3*c*). Por lo tanto, las mitocondrias tienen su propio material genético y los mecanismos para producir su propio RNA y proteínas. Este DNA no cromosómico es importante porque codifica un pequeño número de polipéptidos mitocondriales (13 en los seres humanos) que se integran a la membrana mitocondrial interna con los polipéptidos codificados por genes que se encuentran en el núcleo. El DNA mitocondrial humano también codifica dos RNA ribosómicos y 22 RNA de transferencia (tRNA) que se utilizan en la síntesis de proteínas dentro del organelo. El DNA mitocondrial es una reliquia de la historia antigua. Es el legado de una sola bacteria anaeróbica que se instaló en el citoplasma de una célula primitiva que al final se convirtió en un ancestro de todas las células eucariotas (pág. 25). La mayoría de los genes de este simbionte ancestral se perdió o se transfirió al núcleo en el transcurso de la evolución de la célula hospedadora y sólo dejó un puñado de genes para codificar algunas de las proteínas más hidrófobas de la membrana mitocondrial interna. Por varias razones, el mtDNA es apropiado para su uso en el estudio de las migraciones y la evolución del ser humano. Por ejemplo, varias compañías emplean secuencias de mtDNA para rastrear el linaje de clientes que buscan sus raíces étnicas o geográficas.

Más adelante en el capítulo se regresará a la descripción sobre la configuración molecular de las membranas mitocondriales, pero primero hay que considerar la función de estos

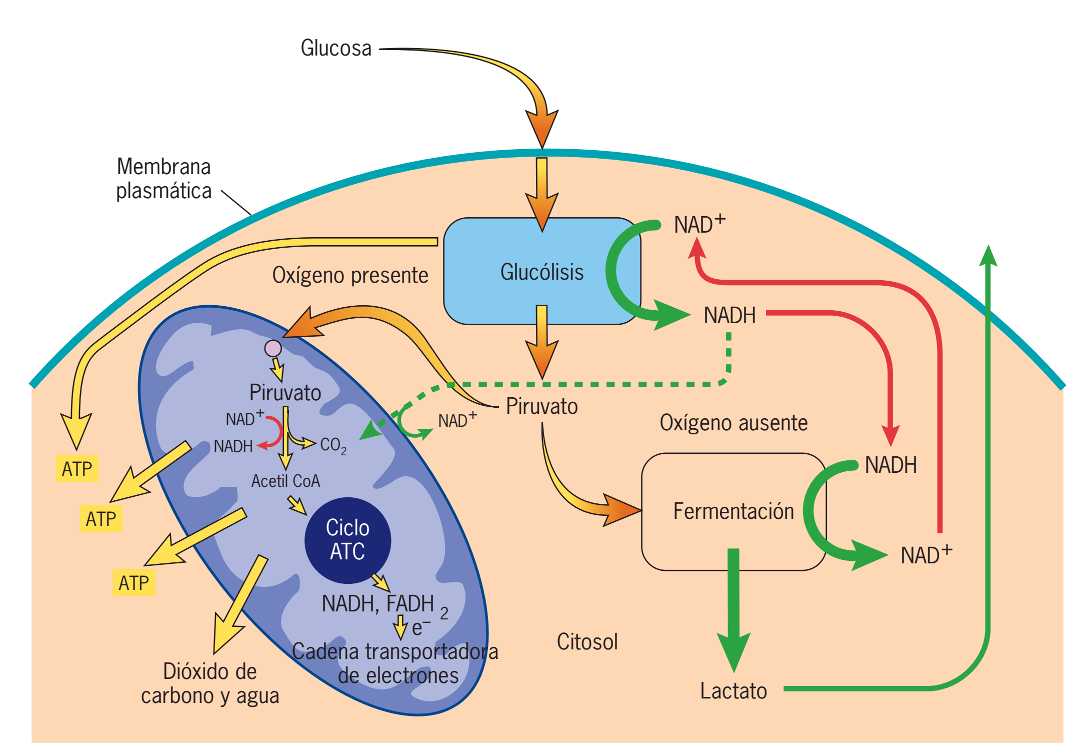


FIGURA 5-5 Una revisión del metabolismo de los carbohidratos en las células eucariotas. Las reacciones de la glucólisis generan piruvato y NADH en el citosol. En ausencia de oxígeno, el piruvato se reduce por acción del NADH hasta lactato (u otro producto de la fermentación, como etanol en las levaduras; véase la figura 3-29 para obtener los detalles). El NAD^+ formado en esta reacción se reutiliza en la continuación de la glucólisis. En presencia de oxígeno, el piruvato se mueve hacia la matriz (algo que facilita un transportador de membrana), donde se descarboxila y se une con la coenzima A (CoA), una reacción que genera NADH. El NADH producido durante la glucólisis dona sus electrones de alta energía a un compuesto que cruza la membrana mitocondrial interna. La acetil-CoA pasa por el ciclo del ATC (como se muestra en la figura 5-7), con lo cual se generan NADH y $FADH_2$. Los electrones de estas moléculas de NADH y $FADH_2$ pasan por la cadena de transporte de electrones, que está formada por portadores incrustados en la membrana mitocondrial interna, hasta llegar al oxígeno molecular (O_2). La energía liberada durante el transporte de electrones se usa en la formación de ATP mediante un proceso descrito con detalles más adelante en este capítulo. Si toda la energía del transporte de electrones se usara en la formación de ATP, podrían generarse cerca de 36 moléculas de ATP a partir de una sola molécula de glucosa.

organelos en las vías oxidativas básicas de las células eucariotas, que se resumen en la figura 5-5. Sería útil examinar esta figura de revisión y leer el pie que la acompaña antes de pasar a las descripciones detalladas de estas vías.

REVISIÓN ?

1. Describa los cambios del metabolismo oxidativo que debieron observarse en la evolución y éxito de las cianobacterias.
2. Compare las propiedades e historia evolutiva de las membranas mitocondriales interna y externa, el espacio intermembranoso y la matriz.

5.2 METABOLISMO OXIDATIVO EN LA MITOCONDRIA

En el capítulo 3 se describen las etapas iniciales de la oxidación de los carbohidratos. A partir de la glucosa, los primeros pasos en el proceso oxidativo los llevan a cabo las enzimas de la glucólisis que se encuentran en el citosol (fig. 5-5). Las 10 reacciones que constituyen la vía glucolítica se ilustraron en la figura 3-23; los pasos principales de la vía se resumen en la figura 5-6. Durante la glucólisis, sólo una pequeña fracción de la energía libre utilizable en la glucosa queda disponible para la célula, la suficiente para la síntesis neta de sólo dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa oxidada (fig. 5-6). La mayor parte de la energía permanece almacenada en el piruvato. Cada molécula de NADH producida durante la oxidación de gliceraldehído 3-fosfato (reacción 6, fig. 5-6) también lleva un par de electrones de alta energía.[1] Los dos productos de la glucólisis, (piruvato y NADH), pueden procesarse de dos formas distintas, según sea el tipo de célula en el que se formen y la presencia o ausencia de oxígeno.

En presencia de oxígeno, los organismos aerobios son capaces de extraer grandes cantidades de energía adicional del piruvato y el NADH producidos durante la glucólisis, suficiente para sintetizar más de 30 moléculas adicionales de ATP. Esta energía se extrae en las mitocondrias (fig. 5-5). Se comenzará con el piruvato para considerar luego el destino del NADH en una parte posterior de la explicación. Cada molécula de piruvato producida en la glucólisis se transporta a través de la membrana mitocondrial interna y hacia la matriz, donde se descarboxila para formar un grupo acetilo de dos carbonos (—CH_3COO^-). El grupo acetilo se transfiere a la *coenzima A* (un compuesto

[1] Los expertos en bioquímica no siempre admiten bien los términos "electrones de alta energía" y "electrones de baja energía", pero transmiten una imagen útil. Como se explica en la página 189, los electrones de alta energía son aquellos que se mantienen con menor afinidad y se transfieren con más facilidad de un donador a un receptor que los electrones de baja energía.

FIGURA 5-6 Revisión de la glucólisis que muestra algunos de los pasos claves. Éstos incluyen dos reacciones en las que se transfieren grupos fosfato de ATP al azúcar de seis carbonos para producir fructosa 1,6-difosfato (pasos 1, 3); la oxidación y fosforilación del gliceraldehído 3-fosfato generan 1,3-difosfoglicerato y NADH (paso 6); y la transferencia de grupos fosfato de los sustratos fosforilados de tres carbonos al ADP produce ATP mediante fosforilación del sustrato (pasos 7 y 10). Hay que recordar que se forman dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato por cada molécula de glucosa, por lo que las reacciones de la sexta a la décima que se muestran aquí ocurren dos veces por cada molécula de glucosa oxidada.

Glucosa

1 — 1 ATP → 1 ADP

2

3 — 1 ATP → 1 ADP

Se fosforila glucosa a expensas de un ATP, que se reordena estructuralmente para formar fosfato de glucosa, y luego vuelve a fosforilarse a expensas de un segundo ATP. Los dos grupos fosfato están situados a ambos extremos (C1, C6) de la cadena de fructosa.

Fructosa 1,6-difosfato

4

5

El difosfato de seis carbonos se rompe en dos monofosfatos de tres carbonos.

Gliceraldehído 3-fosfato (2 moléculas)

6 — 2 P_i; 2 NAD^+ → 2 NADH + 2 H^+

El aldehído de tres carbonos se oxida para formar un ácido cuando los elementos extraídos del sustrato se emplean para reducir la coenzima NAD^+ a NADH. Además, el ácido C1 se fosforila a un fosfato de ácido, con elevado potencial de transferencia de grupo fosfato (que se denota por el sombreado en amarillo).

1,3-difosfoglicerato (2 moléculas)

7 — 2 ADP → 2 ATP

El grupo fosfato de C1 se transfiere a ADP, formando ATP por fosforilación al nivel del sustrato. Se forman dos ATP por cada glucosa que se oxida.

3-fosfoglicerato (2 moléculas)

8

9

Estas reacciones dan por resultado el reordenamiento y la deshidratación del sustrato para formar un fosfato de enol en la posición C2, que tiene elevado potencial de transferencia de grupo fosfato.

Fosfoenolpiruvato (2 moléculas)

10 — 2 ADP → 2 ATP

El grupo fosfato se transfiere a ADP, con lo que forma ATP por fosforilación al nivel del sustrato y genera una cetona en la posición C2. Se forman dos ATP por cada glucosa que se oxida.

Piruvato (2 moléculas)

REACCIÓN NETA:

Glucosa + 2 NAD^+ + 2 ADP + 2 P_i ⟶ 2 Piruvato + 2 ATP + 2 NADH + 2 H^+ + 2 H_2O

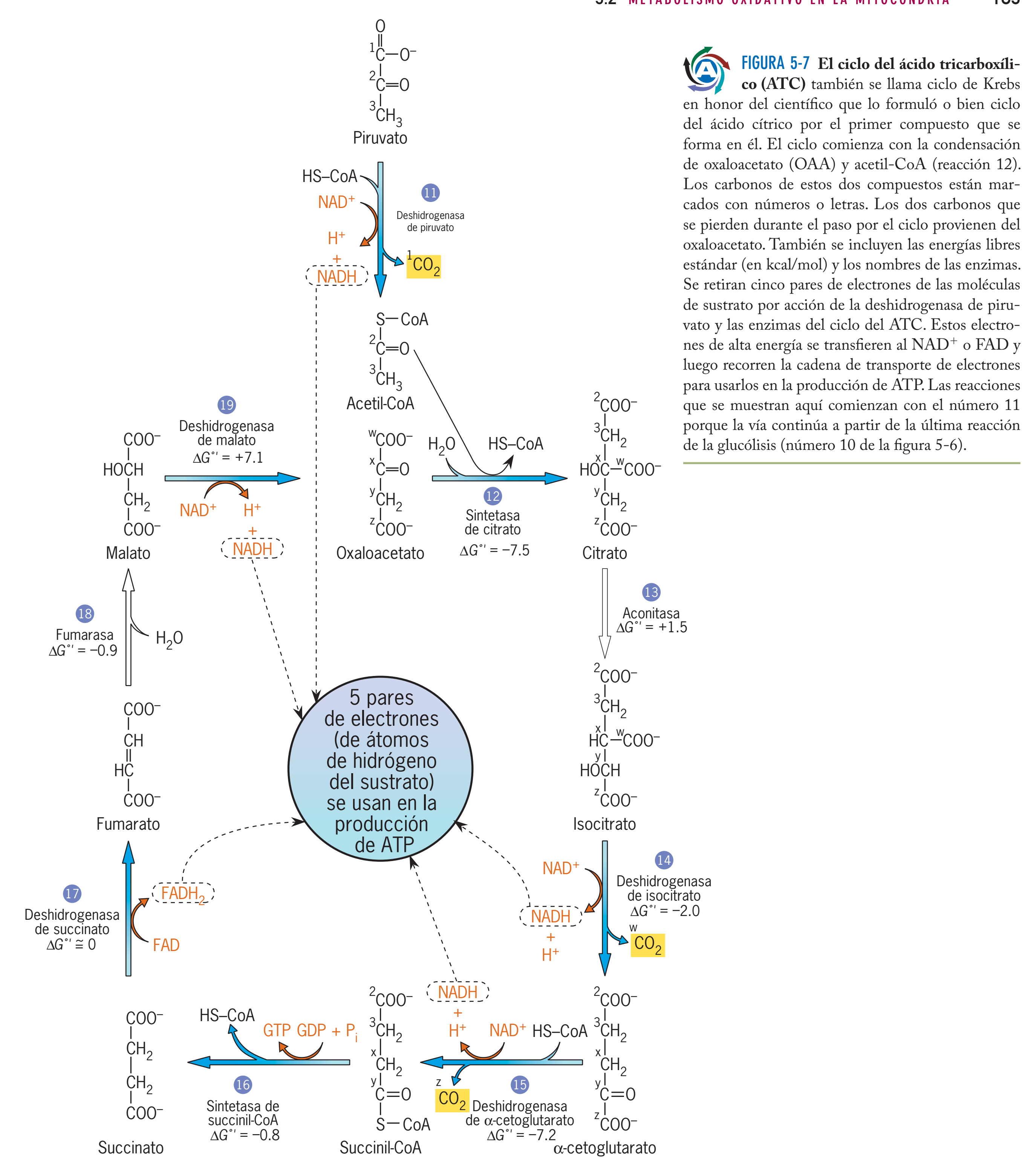


FIGURA 5-7 El ciclo del ácido tricarboxílico (ATC) también se llama ciclo de Krebs en honor del científico que lo formuló o bien ciclo del ácido cítrico por el primer compuesto que se forma en él. El ciclo comienza con la condensación de oxaloacetato (OAA) y acetil-CoA (reacción 12). Los carbonos de estos dos compuestos están marcados con números o letras. Los dos carbonos que se pierden durante el paso por el ciclo provienen del oxaloacetato. También se incluyen las energías libres estándar (en kcal/mol) y los nombres de las enzimas. Se retiran cinco pares de electrones de las moléculas de sustrato por acción de la deshidrogenasa de piruvato y las enzimas del ciclo del ATC. Estos electrones de alta energía se transfieren al NAD^+ o FAD y luego recorren la cadena de transporte de electrones para usarlos en la producción de ATP. Las reacciones que se muestran aquí comienzan con el número 11 porque la vía continúa a partir de la última reacción de la glucólisis (número 10 de la figura 5-6).

orgánico complejo derivado de la vitamina ácido pantoténico) para producir acetil-CoA.

$$\text{Piruvato} + \text{HS—CoA} + NAD^+ \rightarrow \text{acetil-CoA} + CO_2 + NADH + H^+$$

La descarboxilación del piruvato y la transferencia del grupo acetilo a CoA (figuras 5-5 y 5-7) es una reacción que cataliza el complejo multienzimático gigante deshidrogenasa de piruvato, cuya estructura se mostró en la figura 2-39.

El ciclo del ácido tricarboxílico (ATC)

Una vez formada, la acetil-CoA ingresa a una vía cíclica, el **ciclo del ácido tricarboxílico (ATC)**, en el que se oxida el sustrato

y conserva su energía. Excepto por la deshidrogenasa de succinato, que se une con la membrana interna, todas las enzimas del ciclo del ATC residen en la fase soluble de la matriz (fig. 5-5). El ciclo del ATC también se conoce como ciclo de Krebs en honor del bioquímico británico Hans Krebs, quien dilucidó la vía en el decenio de 1930. Cuando Krebs obtuvo suficiente evidencia para apoyar la idea de un ciclo metabólico, presentó los resultados a la publicación británica *Nature*. El documento le fue devuelto varios días después acompañado de una carta de rechazo. El editor había concluido que no era lo bastante importante para publicarlo en la revista. Krebs rápidamente publicó el artículo en otra revista.

El primer paso del ciclo del ATC es la condensación del grupo acetilo de dos carbonos con un oxaloacetato de cuatro carbonos para formar una molécula de citrato de seis carbonos (fig. 5-7, paso 12). Durante el ciclo se reduce la longitud de la molécula de citrato, un carbono a la vez, lo que regenera la molécula de oxaloacetato de cuatro carbonos que puede condensarse con otra de acetil-CoA. Los dos carbonos que se desprenden durante el ciclo del ATC (que no son los mismos que ingresaron con el grupo acetilo) son los que se oxidan por completo hasta dióxido de carbono. Durante el ciclo del ATC ocurren cuatro reacciones en las que un par de electrones se transfieren de un sustrato a una coenzima receptora de electrones. Tres de las reacciones reducen el NAD^+ a NADH y una reacción reduce FAD a $FADH_2$ (fig. 5-7). La ecuación neta de las reacciones del ciclo del ATC puede escribirse así:

$$\text{Acetil-CoA} + 2\,H_2O + FAD + 3\,NAD^+ + GDP + P_i \rightarrow$$
$$2\,CO_2 + FADH_2 + 3\,NADH + 3\,H^+ + GTP + HS\text{—}CoA$$

El ciclo del ATC es una vía metabólica crítica. Si se considera la posición de este ciclo en el metabolismo general de la célula (fig. 5-8; véase también fig. 3-22), se advierte que los metabolitos de este ciclo son los mismos compuestos generados en la mayoría de las vías catabólicas de la célula. Por ejemplo, la acetil-CoA es un producto final importante de varias vías catabólicas, incluida la degradación de ácidos grasos, los cuales se degradan dentro de la matriz de la mitocondria hasta unidades de dos carbonos (fig. 5-8*a*). Estos compuestos de dos carbonos entran al ciclo del ATC como acetil-CoA. El catabolismo de los aminoácidos, los bloques para construir proteínas, también genera metabolitos del ciclo del ATC (fig. 5-8*b*), que entran a la matriz mediante sistemas de transporte especiales en la membrana mitocondrial interna. Parece que todas las macromoléculas que proporcionan energía a la célula (polisacáridos, grasas y

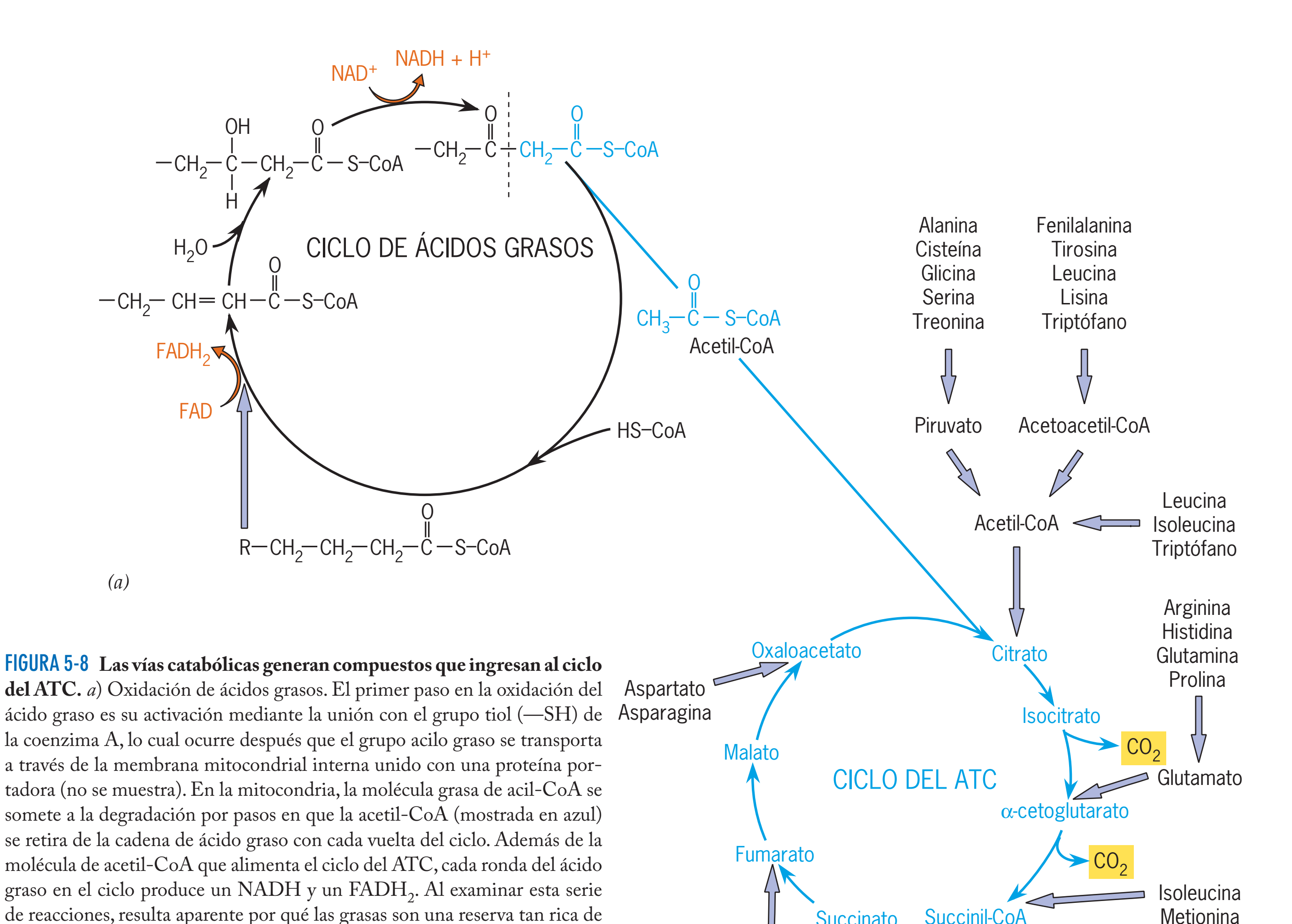


FIGURA 5-8 Las vías catabólicas generan compuestos que ingresan al ciclo del ATC. *a*) Oxidación de ácidos grasos. El primer paso en la oxidación del ácido graso es su activación mediante la unión con el grupo tiol (—SH) de la coenzima A, lo cual ocurre después que el grupo acilo graso se transporta a través de la membrana mitocondrial interna unido con una proteína portadora (no se muestra). En la mitocondria, la molécula grasa de acil-CoA se somete a la degradación por pasos en que la acetil-CoA (mostrada en azul) se retira de la cadena de ácido graso con cada vuelta del ciclo. Además de la molécula de acetil-CoA que alimenta el ciclo del ATC, cada ronda del ácido graso en el ciclo produce un NADH y un $FADH_2$. Al examinar esta serie de reacciones, resulta aparente por qué las grasas son una reserva tan rica de energía química. *b*) Ingreso de aminoácidos al ciclo del ATC.

proteínas) se degradan hasta metabolitos del ciclo del ATC. Por lo tanto, la mitocondria se convierte en el centro de los pasos finales para la conservación de energía, sin importar cuál sea la naturaleza del material inicial.

La importancia de las coenzimas reducidas en la formación de ATP

A partir de la ecuación neta del ciclo del ATC resulta evidente que los productos primarios de la vía son las coenzimas reducidas $FADH_2$ y NADH, que contienen los electrones de alta energía retirados de varios sustratos durante su oxidación. El NADH también es uno de los productos de la glucólisis (junto con el piruvato). Las mitocondrias no son capaces de importar el NADH formado en el citosol durante la glucólisis. En lugar de eso, los electrones de NADH se usan para reducir un metabolito de bajo peso molecular que puede: a) entrar a la mitocondria (mediante una vía llamada lanzadera de malato-aspartato) y reducir el NAD^+ a NADH o b) transferir sus electrones a FAD (por una vía llamada lanzadera de fosfato de glicerol que se muestra en la figura 5-9) para producir $FADH_2$. Ambos mecanismos permiten que los electrones del NADH citosólico ingresen a la cadena mitocondrial de transporte de electrones y se utilicen en la formación de trifosfato de adenosina.

Ahora que se explicó la formación de NADH y $FADH_2$ por glucólisis y en el ciclo del ATC, puede regresarse a los pasos que utilizan estas coenzimas reducidas para producir ATP. El proceso general puede dividirse en dos pasos, que se resumen a continuación:

Paso 1 (fig. 5-10). ***Los electrones de alta energía pasan de $FADH_2$ o NADH*** al primero de una serie de transportadores de electrones que constituyen la cadena transportadora de electrones, localizada en la membrana mitocondrial interna. Los electrones pasan a lo largo de la cadena respiratoria en reacciones que liberan energía. Estas reacciones se vinculan con otras que requieren energía para cambiar la conformación de los portadores de electrones que mueven a los protones a través de la membrana mitocondrial interna. Como resultado, la energía liberada durante el transporte de electrones se almacena en forma de un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana. Al final, los electrones de baja energía se transfieren al receptor final de electrones, es decir, el oxígeno molecular (O_2), que se reduce hasta formar agua.

Paso 2 (fig. 5-10). ***El movimiento controlado de protones de regreso a través de la membrana*** mediante una enzima que sintetiza ATP proporciona la energía necesaria para fosforilar ADP en ATP. Peter Mitchell, de la *University of Edinburgh*, postuló en 1961 la importancia de los movimientos de protones para la formación de ATP. Los experimentos que condujeron a la

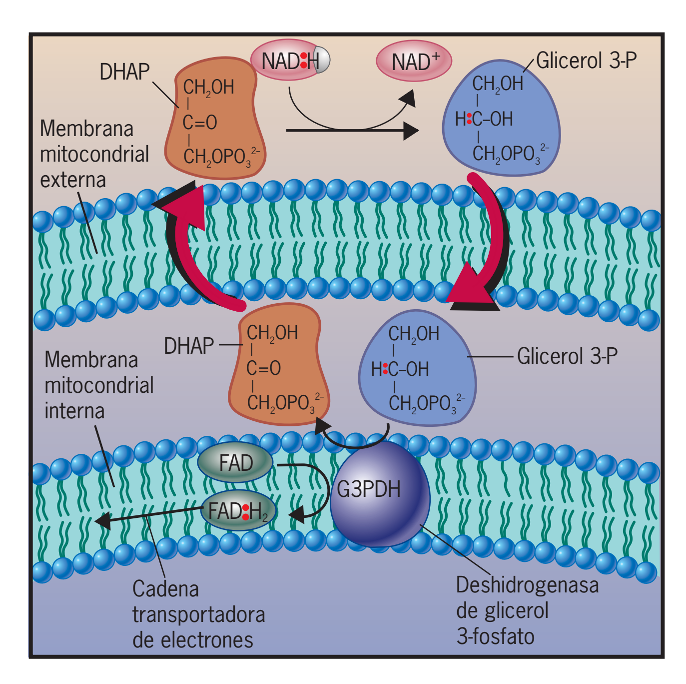


FIGURA 5-9 La lanzadera de fosfato de glicerol. En la lanzadera de fosfato de glicerol, los electrones se transfieren de NADH al fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) para formar glicerol 3-fosfato, que los lanza al interior de la mitocondria. Después, estos electrones reducen el FAD en la membrana mitocondrial interna, con lo que se forma $FADH_2$, que puede transferir los electrones a un portador de la cadena de transporte de electrones.

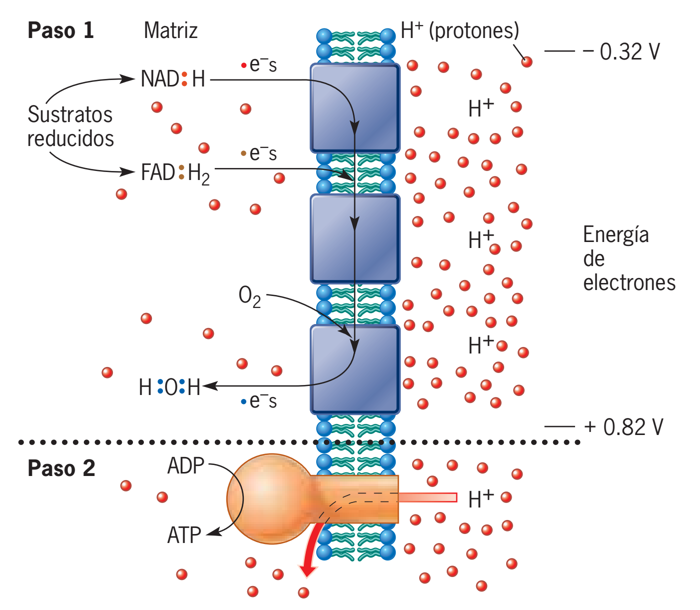


FIGURA 5-10 Resumen del proceso de la fosforilación oxidativa. En el primer paso del proceso, los sustratos como el isocitrato y el succinato, se oxidan (fig. 5-7) y los electrones se transfieren a las coenzimas NAD^+ o FAD para formar NADH o $FADH_2$. Después, estos electrones de alta energía se transfieren mediante una serie de portadores de electrones de la cadena transportadora de electrones. La energía liberada se usa para trasladar los protones de la matriz hacia el espacio intermembranoso, con lo que se establece un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna. En el paso 2, los protones se mueven a favor del gradiente electroquímico a través de un complejo sintetizador de ATP. La energía almacenada en el gradiente se usa para sintetizar ATP. Estos dos pasos esenciales de la fosforilación oxidativa forman la base del mecanismo quimioosmótico propuesto por Peter Mitchell en 1961.

aceptación del **mecanismo quimioosmótico**, como lo denominó Mitchell, se describen en la sección Vías experimentales, que pueden encontrarse en *www.wiley.com/college/karp* en Internet. El análisis de los dos pasos recién resumidos ocupa gran parte del resto de este capítulo.

Cada par de electrones transferido de NADH al oxígeno mediante la cadena transportadora de electrones libera energía suficiente para impulsar la formación de casi tres moléculas de ATP. Cada par donado por $FADH_2$ libera suficiente energía para la formación de dos moléculas de ATP. Si se suman todas las moléculas de ATP formadas a partir de una molécula de glucosa que se cataboliza por completo mediante glucólisis y el ciclo del ATC, la ganancia neta es de unas 36 moléculas de ATP (incluido el GTP formado por cada ronda del ciclo del ATC; paso 16, fig. 5-7). El número real de moléculas de ATP formadas por cada molécula de glucosa oxidada depende de las actividades particulares que realice la célula. En la sección Perspectiva humana se discute la importancia relativa de la glucólisis respecto del ciclo del ATC, esto es, del metabolismo anaeróbico en comparación con el aeróbico, en la función del músculo esquelético humano.

REVISIÓN

1. ¿Cómo se relacionan los dos productos de la glucólisis con las reacciones del ciclo del ATC?
2. ¿Por qué se considera el ciclo del ATC la vía central del metabolismo energético celular?
3. Describa el mecanismo por el cual el NADH producido en el citosol durante la glucólisis es capaz de alimentar con electrones al ciclo del ácido tricarboxílico.

PERSPECTIVA HUMANA

La función de los metabolismos anaeróbico y aeróbico en el ejercicio

La contracción muscular requiere grandes cantidades de energía. La mayor parte de la energía se utiliza para que los filamentos de actina y miosina se deslicen unos sobre otros, como se describe en el capítulo 9. La energía que impulsa la contracción muscular proviene del ATP. La velocidad de la hidrólisis del ATP aumenta más de 100 veces en un músculo esquelético que se somete a la contracción máxima en comparación con ese mismo músculo en reposo. Se estima que el músculo esquelético humano promedio tiene suficiente ATP disponible para impulsar una explosión de contracción vigorosa durante dos a cinco segundos. Incluso conforme se hidroliza el ATP, es importante que se produzca ATP adicional; de lo contrario, la proporción ATP/ADP caería y por tanto la energía libre disponible para impulsar la contracción. Las células musculares contienen una reserva de fosfato de creatina (CrP), uno de los compuestos con mayor potencial de transferencia de fosfato que el ATP (véase fig. 3-28), por lo que puede usarse para generar ATP en la reacción siguiente:

$$\text{CrP} + \text{ADP} \rightarrow \text{Cr} + \text{ATP}$$

Por lo general, los músculos esqueléticos tienen suficiente fosfato de creatina almacenado para mantener niveles altos de ATP durante unos 15 segundos. Como las células musculares tienen un suministro limitado de ATP y fosfato de creatina, se infiere que la actividad muscular intensa o sostenida requiere la formación de mayores cantidades de ATP, que deben obtenerse por metabolismo oxidativo.

Los músculos esqueléticos humanos están formados de dos tipos generales de fibras (fig. 1): las fibras de sacudida rápida, que pueden contraerse con gran rapidez (p. ej., 15 a 40 mseg), y las fibras de sacudida lenta que se contraen con más lentitud (40 a 100 mseg). Usando un microscopio electrónico, las fibras rápidas se ven casi carentes de mitocondrias, lo cual indica que estas células son incapaces de producir mucho ATP mediante la respiración aeróbica. Por otro lado, las fibras lentas contienen grandes cantidades de mitocondrias. Estos dos tipos de fibras de músculo esquelético son adecuadas para distintos tipos de actividades. Por ejemplo, el levantamiento de pesas o las carreras cortas y rápidas dependen sobre todo de las fibras rápidas, capaces de generar más fuerza que las lentas. Las fibras rápidas producen casi todo su ATP en forma anaeróbica mediante la glucólisis. Aunque la glucólisis sólo produce cerca de 5% de ATP por cada molécula de glucosa oxidada en comparación con la respiración aeróbica, las reacciones de la glucólisis son mucho más rápidas que las del ciclo del ATC y el transporte de electrones; por consiguiente, la velocidad de producción anaeróbica de ATP es mayor que la alcanzada por la respiración aeróbica. Los problemas para producir ATP por glucólisis son el uso rápido de la

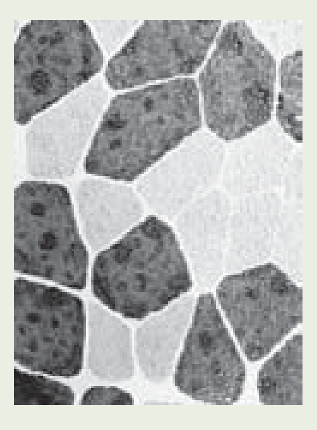


FIGURA 1 **Los músculos esqueléticos** contienen una combinación de fibras de sacudida rápida (o tipo II) (teñidas de color oscuro) y fibras de sacudida lenta (o tipo I) (teñidas de color claro). (Cortesía de Duncan MacDougall.)

glucosa disponible en la fibra (almacenada en forma de glucógeno) y la producción de un producto final indeseable, el ácido láctico. A continuación se describe mejor este último aspecto.

Hay que recordar que para la continuación de la glucólisis es necesaria la regeneración de NAD^+, lo cual ocurre por fermentación (pág. 113). Las células musculares regeneran el NAD^+ a través de la reducción del piruvato (producto final de la glucólisis) en ácido láctico. La mayor parte del ácido láctico se difunde fuera de las células musculares activas hacia la sangre y de ahí se traslada al hígado y se convierte de nueva cuenta en glucosa. La glucosa producida por el hígado se libera a la sangre, de donde puede regresar a los músculos activos para mantener la intensidad de la glucólisis. Sin embargo, la formación de ácido láctico se acompaña de un descenso del pH dentro del tejido muscular (pH de 7.00 a 6.35), lo cual causa el dolor y los calambres que acompañan al ejercicio vigoroso. Es probable que el aumento de la acidez, junto con el agotamiento de las reservas de glucógeno, explique la sensación de fatiga muscular que acompaña a los ejercicios anaeróbicos.[1]

Si en lugar de intentar usar los músculos para levantar pesas o correr a máxima velocidad se realizara un ejercicio aeróbico, como montar en bicicleta o caminar aprisa, se puede mantener la actividad por periodos mucho más prolongados sin sentir dolor muscular o fatiga. Como su nombre indica, el ejercicio aeróbico está diseñado para permitir que los músculos mantengan la actividad aeróbica, es decir, que prosigan la producción de ATP mediante la transferencia de electrones y la fosforilación oxidativa. Los ejercicios aeróbicos dependen en buena medida de la contracción de las fibras musculares lentas. Aunque estas fibras generan una fuerza menor, pueden continuar su función por periodos prolongados por la continuidad de la producción aeróbica de ATP sin producir ácido láctico.

[1] Puede consultarse un punto de vista alterno en *Science* 305:1112, 2004.

Al principio, el ejercicio aeróbico lo promueven las moléculas de glucosa almacenadas como glucógeno en los músculos mismos, pero después de unos cuantos minutos los músculos dependen cada vez más de los ácidos grasos libres que se trasladan a la sangre desde el tejido adiposo. Cuanto más prolongado sea el ejercicio, mayor es la dependencia de los ácidos grasos. Después de 20 min de ejercicio aeróbico vigoroso se estima que casi 50% de las calorías que se consumen en los músculos proviene de la grasa. El ejercicio aeróbico, como el trote, la caminata rápida, la natación o el ciclismo, son de las mejores maneras de reducir el contenido corporal de grasa.

La proporción entre fibras rápidas y lentas varía de un músculo particular a otro. Por ejemplo, los músculos posturales de la espalda que son necesarios para que una persona permanezca de pie tienen una mayor proporción de fibras lentas que los músculos de los brazos, empleados para lanzar o levantar un objeto. La proporción precisa entre fibras rápidas y lentas en un músculo particular depende de factores genéticos y varía en grado notable de una persona a otra, lo que hace posible que un individuo sobresalga en cierto tipo de actividades físicas. Por ejemplo, los mejores velocistas y levantadores de pesas del mundo poseen casi siempre una mayor proporción de fibras rápidas que los corredores de largas distancias. Además, el entrenamiento para deportes como el levantamiento de pesas produce un crecimiento desproporcionado de las fibras rápidas.

El tejido muscular del corazón también debe aumentar su nivel de actividad durante el ejercicio vigoroso, pero a diferencia del músculo esquelético, el corazón sólo puede producir ATP mediante el metabolismo aeróbico. De hecho, casi 40% del espacio citoplásmico de la célula miocárdica humana está ocupado por mitocondrias.

5.3 LA FUNCIÓN DE LA MITOCONDRIA EN LA FORMACIÓN DE ATP

Con frecuencia las mitocondrias se describen como plantas energéticas en miniatura. Al igual que las plantas productoras de energía, las mitocondrias extraen la energía de materiales orgánicos y la almacenan por un tiempo en forma de energía eléctrica. En términos más específicos, la energía obtenida de los sustratos se utiliza para generar un gradiente iónico a través de la membrana mitocondrial interna. Éste representa una forma de energía que puede derivarse para realizar trabajo. En el capítulo 4 se describió la forma en que las células intestinales emplean un gradiente iónico a través de su membrana plasmática para transportar azúcares y aminoácidos fuera de la luz intestinal, de la misma forma que las células nerviosas usan un gradiente similar para conducir impulsos neurales. El uso de gradientes iónicos como forma de energía requiere varios componentes, incluido un sistema para generar el gradiente, una membrana capaz de mantenerlo y los mecanismos para derivar el gradiente de tal manera que pueda realizar trabajo.

Las mitocondrias emplean un gradiente iónico a través de su membrana interna para impulsar muchas actividades que requieren energía, en particular la síntesis de ATP. Cuando la formación de ATP se impulsa con la energía liberada de los electrones retirados durante la oxidación de un sustrato, el proceso se conoce como **fosforilación oxidativa** y se resume en la figura 5-10. La fosforilación oxidativa puede contrastarse con la fosforilación al nivel del sustrato, como se explica en la página 112; en ese proceso se forma ATP de manera directa por la transferencia de un grupo fosfato de una molécula de sustrato a ADP. De acuerdo con una estimación, la fosforilación oxidativa explica la producción de más de 2×10^{26} moléculas (> 160 kg) de ATP en el cuerpo humano cada día. El descubrimiento del mecanismo básico de la fosforilación oxidativa ha sido uno de los principales logros en el campo de la biología celular y molecular; aún continúa la investigación activa para llenar los vacíos restantes. Para comprender el mecanismo de la fosforilación oxidativa, primero es necesario considerar cómo es que la oxidación de un sustrato puede liberar energía libre.

Potenciales de oxidación-reducción

Si se comparan varios agentes oxidantes, pueden ordenarse en una serie de acuerdo con su afinidad por los electrones: mientras mayor sea la afinidad, más potente es el agente oxidante. Los agentes reductores también pueden clasificarse según sea su afinidad por los electrones: mientras menor sea la afinidad (mayor facilidad para liberar los electrones), más fuerte es el agente reductor. Para poner esto en términos cuantificables, los agentes reductores se ordenan de acuerdo con el **potencial para transferir electrones**; las sustancias que poseen un mayor potencial de transferencia de electrones, como el NADH, son agentes

reductores potentes, mientras que aquellos con un bajo potencial de transferencia de electrones, como el H_2O, son agentes reductores débiles. Los agentes oxidantes y reductores se encuentran *en parejas*, como NAD^+ y NADH, que difieren en su número de electrones. Los agentes reductores potentes se unen con agentes oxidantes débiles y viceversa. Por ejemplo, NAD^+ (de la pareja NAD^+-NADH) es un agente oxidante débil, mientras que el O_2 (de la pareja O_2-H_2O) es un agente oxidante fuerte.

Como el movimiento de electrones genera una separación de carga, la afinidad de las sustancias por los electrones puede medirse con instrumentos que detectan el voltaje (fig. 5-11). Lo que se mide para una pareja determinada es un **potencial de oxidación-reducción** (o **potencial redox**) relativo al potencial para la misma pareja estándar. Se eligió en forma arbitraria como pareja estándar al hidrógeno (H^+-H_2). Como sucede con los cambios de energía libre, en los que se utilizó el cambio en energía libre, $\Delta G°$, se emplea una asignación similar para las parejas redox. El potencial redox de la pareja estándar, E_0, para una pareja determinada se designa como el voltaje producido por una media célula (sólo con presencia de miembros de una pareja) donde cada miembro de la pareja esté presente en una concentración estándar en condiciones normales (como en la fig. 5-11). Las concentraciones estándar son 1.0 M para los solutos e iones y 1 atm para los gases (p. ej., H_2) a 25°C. El potencial redox estándar para la reacción de oxidación-reducción que incluye al hidrógeno ($2H^+ + 2$ electrones $\rightarrow H_2$) es 0.00 V. El cuadro 5-1 presenta los potenciales redox para algunas parejas de importancia biológica. El valor para la pareja de hidrógeno en el cuadro no es 0.00, sino –0.42 V. Este número representa el valor cuando la concentración de H^+ es 10^{-7} M (pH de 7.0) en lugar de 1.0 M (pH de 0.0), que tendría poca aplicación fisiológica. Cuando se calcula con un pH de 7, el potencial redox estándar se indica con el símbolo E'_0 en lugar de E_0. La asignación del signo (positivo o negativo) a las parejas es arbitrario y varía entre las distintas disciplinas. Se considera la asignación de la siguiente manera. A las parejas cuyos agentes reductores son mejores donantes de electrones se les asignan potenciales redox más negativos. Por ejemplo, el potencial redox estándar para la pareja NAD^+-NADH es –0.32 V (cuadro 5-1). El acetaldehído es un agente reductor más fuerte que el NADH y la pareja acetato-acetaldehído tiene un potencial redox estándar de –0.58 V. Las parejas cuyos agentes oxidantes son mejores receptores de electrones que el NAD^+, es decir, que poseen mayor afinidad por los electrones que el NAD^+, tienen potenciales redox más positivos.

De la misma forma que cualquier otra reacción espontánea se acompaña de pérdida de energía, así sucede con las reacciones de oxidación-reducción. El cambio estándar de energía libre durante una reacción del tipo siguiente

$$A_{(ox)} + B_{(red)} \rightleftharpoons A_{(red)} + B_{(ox)}$$

puede calcularse a partir de los potenciales redox estándar de las dos parejas incluidas en la reacción de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta G°' = -nF\Delta E'_0$$

donde n es el número de electrones transferidos en la reacción, F es la constante de Faraday (23.063 kcal/V · mol) y $\Delta E'_0$ es la diferencia en voltios entre los potenciales redox estándar de

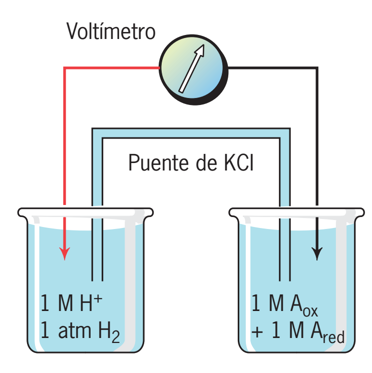


FIGURA 5-11 Medición del potencial de oxidorreducción (redox) estándar. La semicélula muestra contiene los miembros oxidado y reducido de la pareja, ambos en concentraciones de 1 M. La semicélula de referencia contiene una solución 1 M de H^+ que está en equilibrio con el gas hidrógeno a 1 atm de presión. Se forma un circuito eléctrico mediante la conexión de las semicélulas con un voltímetro y un puente de sal. Si los electrones fluyen con preferencia de la semicélula muestra hacia la de referencia, el potencial redox estándar (E_0) de la pareja muestra es negativo; si el flujo de electrones toma el sentido contrario, el potencial redox estándar de la pareja muestra es positivo. El puente de sal, consistente en solución saturada de KCl, suministra un trayecto para que los iones contrarios se muevan entre las semicélulas y mantengan la neutralidad eléctrica en los dos compartimientos.

las dos parejas. Mientras mayor sea la diferencia en el potencial redox estándar entre las dos parejas, más avanza la reacción en condiciones estándar hasta la formación de productos antes de alcanzar un estado de equilibrio. Ahora considérese la reacción

Cuadro 5-1 Potenciales redox estándar de algunas semirreacciones

Ecuación de electrodo	E'_0(V)
Succinato + CO_2 + 2 H^+ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ α-cetoglutarato + H_2O	−0.670
Acetato + 2 H^+ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ acetaldehído	−0.580
2 H^+ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ H_2	−0.421
α-cetoglutarato + CO_2 + 2 H^+ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ isocitrato	−0.380
Cistina + 2 H^+ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ 2 cisteína	−0.340
NAD^+ + 2 H^+ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ NADH + H^+	−0.320
$NADP^+$ + 2 H^+ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ NADPH + H^+	−0.324
Acetaldehído + 2 H^+ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ etanol	−0.197
Piruvato + 2 H^+ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ lactato	−0.185
Oxaloacetato + 2 H^+ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ malato	−0.166
FAD + 2 H^+ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ $FADH_2$ (en flavoproteínas)	+0.031
Fumarato + 2 H^+ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ succinato	+0.031
Ubiquinona + 2 H^+ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ ubiquinol	+0.045
2 citocromo $b_{(ox)}$ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ 2 citocromo $b_{(red)}$	+0.070
2 citocromo $c_{(ox)}$ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ 2 citocromo $c_{(red)}$	+0.254
2 citocromo $a_{3(ox)}$ + 2 e^- $\rightleftharpoons$ 2 citocromo $a_{3(red)}$	+0.385
$\frac{1}{2}O_2$ + $2H^+$ + $2e^-$ $\rightleftharpoons$ H_2O	+0.816

en la que el NADH, un agente reductor potente, se oxida con oxígeno molecular, un agente oxidante fuerte.

$$NADH + \frac{1}{2}O_2 + H^+ \rightarrow H_2O + NAD^+$$

Los potenciales redox estándar de las dos parejas pueden escribirse como sigue:

$$\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O \qquad E'_0 = +0.82\ V$$

$$NAD^+ + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NADH + H^+ \qquad E'_0 = -0.32\ V$$

El cambio de voltaje para la reacción total es igual a la diferencia entre los dos valores de E'_0 ($\Delta E'_0$):

$$\Delta E'_0 = +0.82\ V - (-0.32\ V) = 1.14\ V$$

que es una medida de la energía libre liberada cuando NADH se oxida por el oxígeno molecular en condiciones estándar. Si se sustituye este valor en la ecuación previa;

$$\Delta G^{\circ\prime} = (-2)(23.063\ kcal/V \cdot mol)(1.14V)$$
$$= -52.6\ kcal/mol\ de\ NADH\ oxidado$$

la diferencia en la energía libre estándar ($\Delta G^{\circ\prime}$) es −52.6 kcal/mol. Tal y como ocurre con otras reacciones, los valores reales de ΔG dependen de las concentraciones relativas de reactivos y productos (versiones oxidadas y reducidas de los compuestos) presentes en una célula en un instante determinado. Al margen de lo anterior, parece que el descenso de energía libre de un par de electrones a su paso de NADH al oxígeno molecular ($\Delta G^{\circ\prime} = -52.6$ kcal/mol) debe ser suficiente para impulsar la formación de varias moléculas de ATP ($\Delta G^{\circ\prime} = +7.3$ kcal/mol) aun en condiciones celulares, en las que las proporciones ATP/ADP son mucho más altas que las de condiciones estándar. La transferencia de esta energía de NADH a ATP dentro de la mitocondria ocurre en una serie de pequeños pasos liberadores de energía que son el tema principal de la discusión en el resto del capítulo.

Los electrones se transfieren a NAD^+ (o FAD) dentro de la mitocondria a partir de varios sustratos del ciclo del ATC, que son isocitrato, cetoglutarato alfa, malato y succinato (reacciones 14, 15 a 16, 19 y 17 de la figura 5.7, respectivamente). Los primeros tres de estos intermediarios tienen potenciales redox con valores negativos relativamente altos (cuadro 5-1); son lo bastante altos para transferir electrones a NAD^+ *en las condiciones que prevalecen en la célula*.[2] En cambio, la oxidación de succinato a fumarato, que tiene un potencial redox más positivo, procede por la reducción de FAD, una coenzima con mayor afinidad por los electrones que NAD^+.

[2] Como se indica en el cuadro 5-1, el potencial redox estándar (E'_0) del par oxaloacetato-malato es más positivo que el del par NAD^+-NADH. Por lo tanto, la oxidación de malato a oxalacetato tiene $\Delta G^{\circ\prime}$ positiva (reacción 19, fig. 5-7) y puede proceder hasta la formación de oxaloacetato sólo cuando la proporción entre productos y reactivos se mantiene por debajo de la que prevalece en condiciones estándar. La ΔG de esta reacción se conserva negativa mediante el mantenimiento de concentraciones muy bajas de oxaloacetato, lo cual es posible porque la siguiente reacción en el ciclo (reacción 12, fig. 5-7) es altamente exergónica y es catalizada por una de las principales enzimas que controlan la velocidad de reacción en el ciclo del ATC.

Transporte de electrones

Cinco de las nueve reacciones ilustradas en la figura 5-7 están catalizadas por deshidrogenasas, enzimas que transfieren pares de electrones de sustratos a coenzimas. Cuatro de estas reacciones generan NADH, una produce $FADH_2$. Las moléculas de NADH, que se forman en la matriz mitocondrial, se disocian de sus deshidrogenasas respectivas y se unen con la deshidrogenasa de NADH, una proteína integral de la membrana mitocondrial interna (véase fig. 5-17). A diferencia de las otras enzimas del ciclo del ATC, la deshidrogenasa de succinato, la enzima que cataliza la formación de $FADH_2$ (fig. 5-7, reacción 17), es un componente de la membrana mitocondrial interna. En cualquier caso, los electrones de alta energía relacionados con NADH o $FADH_2$ se transfieren por una serie de portadores específicos de electrones que constituyen la **cadena de transporte de electrones** (o **cadena respiratoria**) de la membrana mitocondrial interna.

Tipos de portadores de electrones

La cadena transportadora de electrones se compone de cinco tipos de portadores de electrones unidos con la membrana: flavoproteínas, citocromos, átomos de cobre, ubiquinona y proteínas con hierro y azufre. Excepto por la ubiquinona, todos los centros de redox dentro de la cadena respiratoria que aceptan y donan electrones son *grupos prostéticos*, es decir, componentes no aminoácidos que mantienen una relación estrecha con las proteínas.

- Las **flavoproteínas** consisten en un polipéptido unido con fuerza a uno de dos grupos prostéticos relacionados, ya sea dinucleótido de flavina adenina (FAD) o mononucleótido de flavina (FMN) (fig. 5-12*a*). Los grupos prostéticos de las flavoproteínas derivan de la riboflavina (vitamina B_2) y cada uno es capaz de aceptar y donar dos protones y dos electrones. Las principales flavoproteínas de las mitocondrias son la deshidrogenasa de NADH de la cadena de transporte de electrones y la deshidrogenasa de succinato del ciclo del ácido tricarboxílico.
- Los **citocromos** son proteínas que contienen grupos prostéticos *hemo* (como el descrito para la mioglobina en la página 58). El átomo de hierro de un grupo hemo presenta una transmisión reversible entre los estados de oxidación Fe^{3+} y Fe^{2+} como resultado de la aceptación y pérdida de un solo electrón (fig. 5-12*b*). Hay tres tipos distintos de citocromo: *a*, *b* y *c* en la cadena transportadora de electrones que difieren entre sí por las sustituciones dentro del grupo hemo (indicado por las porciones sombreadas azules en la figura 5-12*b*).
- **Tres átomos de cobre** localizados dentro de un solo complejo proteico de la membrana mitocondrial interna (véase fig. 5-19), aceptan y donan un solo electrón cuando alternan entre los estados de oxidación Cu^{2+} y Cu^{1+}.
- La **ubiquinona** (UQ o coenzima Q) es una molécula liposoluble que contiene una cadena hidrófoba larga compuesta de unidades isoprenoides de cinco carbonos (fig. 5-12*c*). Al igual que las flavoproteínas, cada ubiquinona puede aceptar y donar dos electrones y dos protones. La molécula en estado de reducción parcial es el radical libre ubisemiquinona

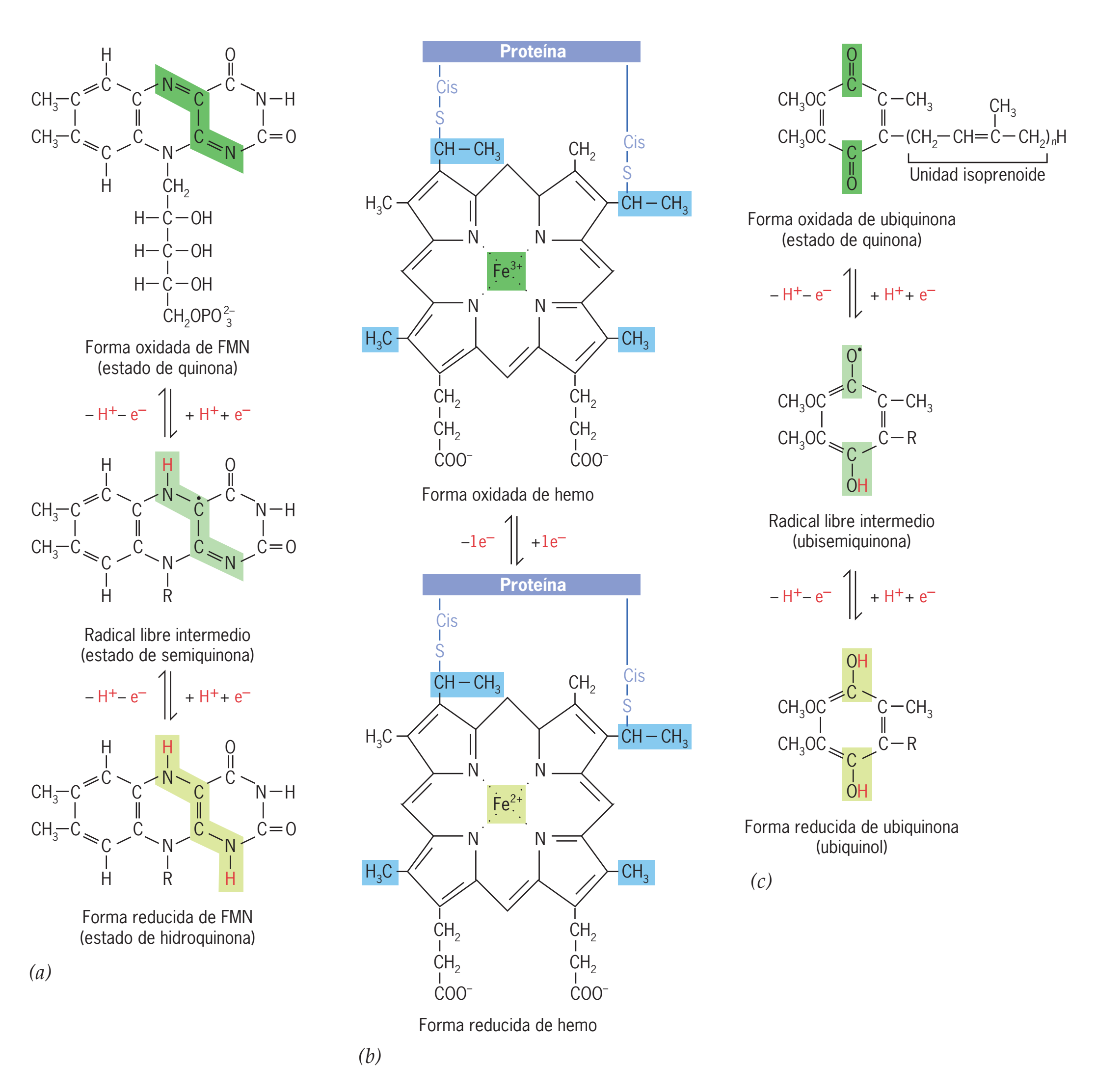


FIGURA 5-12 Estructuras de las formas oxidada y reducida de tres tipos de portadores de electrones. *a)* FMN y deshidrogenasa de NADH; *b)* el grupo hemo del citocromo *c*; y *c)* ubiquinona (coenzima Q). Los grupos hemo de los diversos citocromos de la cadena transportadora de electrones difieren en las sustituciones en los anillos de porfirina (indicado por la sombra azul) y el tipo de enlace con la proteína. Los citocromos pueden aceptar sólo un electrón, mientras que FMN y las quinonas pueden aceptar dos electrones y dos protones en reacciones sucesivas, como se muestra. FAD difiere de FMN porque tiene un grupo adenosina unido con el fosfato.

y la molécula reducida por completo es ubiquinol (UQH_2). La ubiquinona permanece dentro de la bicapa lipídica de la membrana, donde se puede difundir con rapidez hacia los lados.

- Las **proteínas** con **hierro y azufre** son proteínas que contienen hierro en las que los átomos de este metal no se localizan dentro de un grupo hemo, sino que están unidos con átomos de azufre inorgánico como parte del *centro de hierro-azufre.* Los centros más frecuentes contienen dos o cuatro átomos de hierro y azufre, designados [2Fe-2S] y [4Fe-4S], y vinculados con la proteína en los residuos de cisteína (fig. 5-13). Aunque un solo centro puede tener varios átomos de hierro, el complejo entero es capaz de aceptar y donar un solo electrón. El potencial redox de un centro hierro-azufre depende de la hidrofobicidad y la carga de los residuos de aminoácidos que constituyen su ambiente local. Como grupo, las proteínas con hierro-azufre tienen potenciales que van de –700 mV a cerca de +300 mV, correspondiente a una porción considerable del espectro en el que ocurre el transporte de electrones. Se han identificado más de una docena de centros de hierro-azufre diferentes dentro de las mitocondrias.

Los portadores de la cadena transportadora de electrones están dispuestos en orden de potencial redox positivo creciente (fig. 5-14). Cada portador se reduce con la ganancia de electrones a partir del portador precedente en la cadena y luego se oxida por la pérdida de electrones a favor del portador que le sigue. Por lo tanto, los electrones se pasan de un portador al siguiente y pierden energía conforme se desplazan "colina abajo" a lo largo

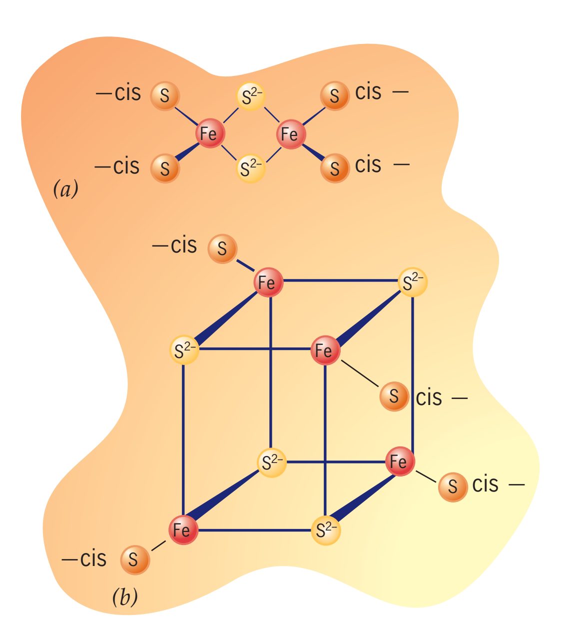


FIGURA 5-13 **Centros de hierro-azufre**. Estructura de un centro de hierro-azufre [2Fe-2S] *a)* y uno [4Fe-4S] *b)*. Ambos centros de hierro-azufre se unen con proteínas mediante enlaces con un átomo de azufre (mostrado en naranja) de un residuo de cisteína. Los iones sulfuro inorgánicos (S^{2-}) aparecen en amarillo. Ambos tipos de centros de hierro-azufre aceptan un solo electrón, cuya carga se distribuye entre los diversos átomos de hierro.

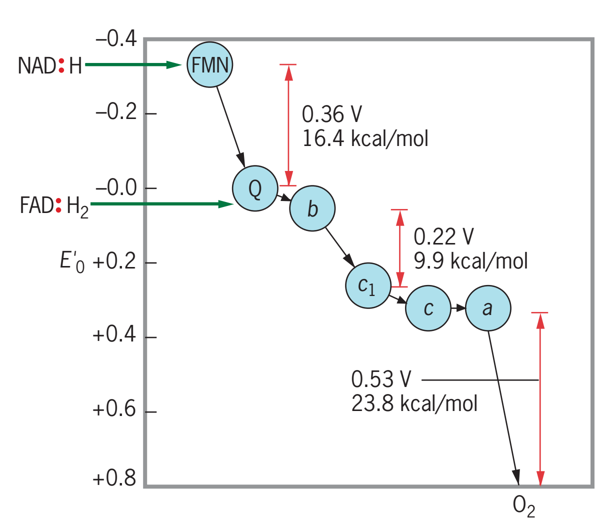


FIGURA 5-14 **Disposición de varios portadores en la cadena transportadora de electrones.** El diagrama ilustra el potencial redox aproximado de los portadores y el declive de la energía libre cuando los pares de electrones se mueven a lo largo de la cadena respiratoria hasta el oxígeno molecular. Los numerosos centros de hierro-azufre no están indicados en esta figura para conservarla esquemática. Como se explica en la sección siguiente, cada una de las tres transferencias de electrones marcadas por flechas rojas aporta energía suficiente para mover protones a través de la membrana mitocondrial interna, lo que a su vez proporciona la energía necesaria para generar ATP a partir de ADP. (TOMADA DE A. L. LEHNINGER, BIOCHEMISTRY, 2ND ED. 1975. WORTH PUBLISHERS, NUEVA YORK.)

de la cadena. El aceptor final de esta "cadena de cubos" de electrones es O_2, el cual acepta los electrones con energía agotada y se reduce para formar agua. Britton Chance y colaboradores de la *University of Pennsylvania* descubrieron la secuencia específica de los portadores que constituyen la cadena transportadora de electrones con diversos inhibidores que bloqueaban el transporte de electrones en sitios específicos a lo largo de la ruta. En la figura 5-15 se muestra una analogía del concepto de estos experimentos. En cada caso se agregó un inhibidor a las células y se identificó el estado de oxidación de varios portadores de electrones en las células inhibidas. Esta identificación puede efectuarse con un espectrofotómetro que mide la absorción de la luz de una muestra en varias longitudes de onda. La medición revela si un portador particular está en el estado reducido u oxidado. En el caso presentado en la figura 5-15, la adición de antimicina A bloqueó el transporte de electrones en el sitio que dejaba NADH, $FMNH_2$, QH_2 y citocromo *b* en estado reducido y los citocromos *c* y *a* en el estado oxidado. Este resultado indica que NAD, FMN, Q y citocromo *b* se localizan "corriente arriba" del bloqueo. En contraste, un inhibidor (p. ej., rotenona) que actúa entre FMN y Q sólo dejaría a NADH y $FMNH_2$ en el estado reducido. Por consiguiente, al identificar los componentes reducidos y oxidados en presencia de distintos inhibidores, puede establecerse la secuencia de los portadores.

La tendencia de los electrones a transferirse de un portador al siguiente depende de la diferencia de potencial entre los dos centros redox, pero la velocidad de transferencia guarda relación con las actividades catalíticas de las proteínas implicadas. Esta

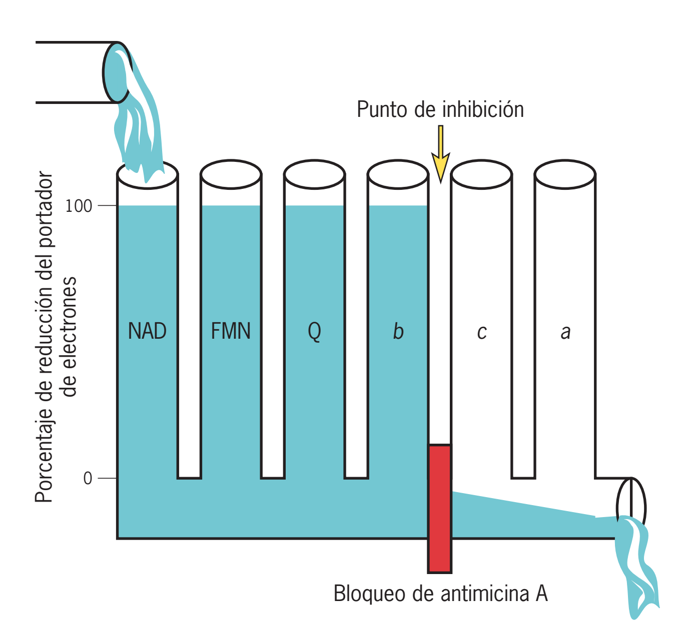


FIGURA 5-15 **Uso experimental de los inhibidores para identificar la secuencia de los portadores en la cadena transportadora de electrones.** En esta analogía hidráulica, el tratamiento de las mitocondrias con el inhibidor antimicina A deja a los portadores corriente arriba (NADH) del punto de inhibición en el estado reducido total y a los portadores corriente abajo (O_2) en el estado oxidado completo. La comparación de los efectos de varios inhibidores reveló el orden de los portadores en la cadena. (TOMADA DE A. L. LEHNINGER, BIOCHEMISTRY, 2ND ED., 1975, WORTH PUBLISHERS, NUEVA YORK.)

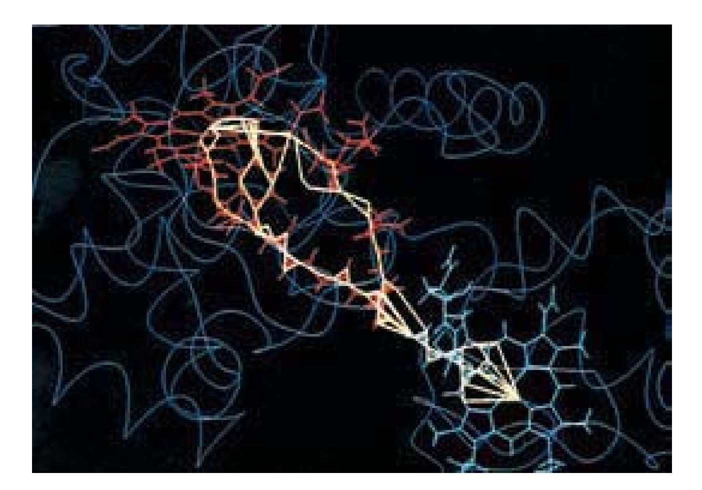


FIGURA 5-16 Trayecto de túneles de electrones para el complejo citocromo *c*-peroxidasa de citocromo *c* de la levadura. El grupo hemo del citocromo *c* es azul y el de la peroxidasa de citocromo *c* (que no es un portador en la cadena mitocondrial de transporte de electrones, sino que proporciona un receptor análogo de electrones del cual se conoce la estructura cristal de alta resolución) es rojo. Existen varios trayectos definidos (amarillo) para el movimiento de electrones de un hemo a otro. Cada uno de los trayectos transporta electrones por varios residuos de aminoácidos situados entre los grupos hemo. (Puede señalarse que se han propuesto otros mecanismos de transferencia de electrones.) (De Jeffrey J. Regan y J. N. Onuchic, tomada de David N. Beratan et al; reimpresa con autorización de Science 258:1741, 1992. © 1992, American Association for the Advancement of Science.)

diferenciación entre la termodinámica y la cinética es similar a la explicada en la página 94 respecto de la actividad de las enzimas. Los estudios indican que los electrones pueden transcurrir distancias considerables (10 a 20 Å) entre centros redox adyacentes y que es probable que los electrones fluyan por "túneles" especiales consistentes en una serie de enlaces covalentes y de hidrógeno que se extienden entre las partes de varios residuos de aminoácidos. La figura 5-16 muestra un ejemplo de una de estas vías propuestas referente al citocromo *c*.

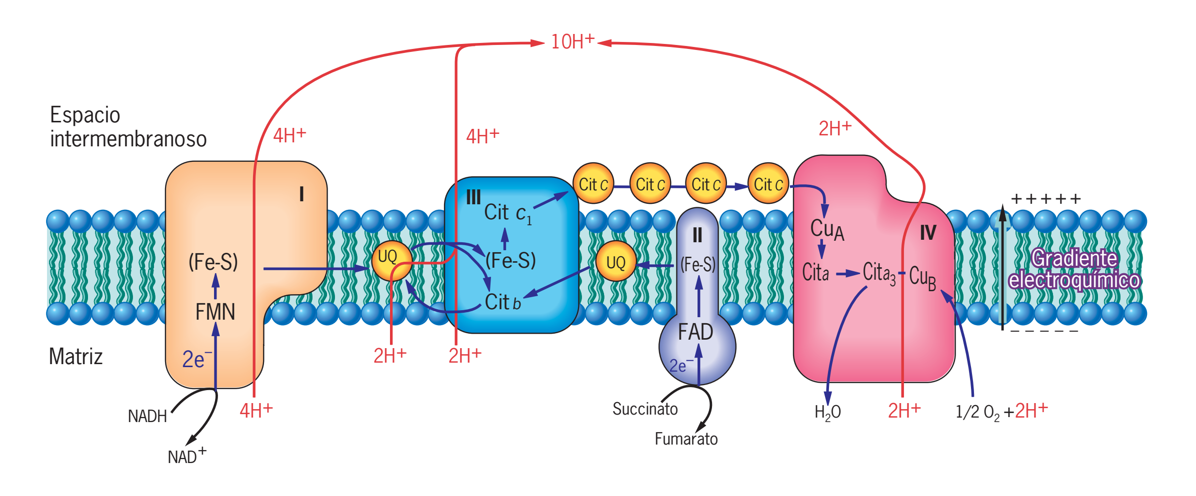
Complejos transportadores de electrones Cuando se rompe la membrana mitocondrial interna con un detergente pueden aislarse los diversos portadores de electrones como parte de cuatro complejos distintos asimétricos que cruzan toda la membrana y que se identifican como complejos I, II, III y IV (fig. 5-17). A cada uno de estos cuatro complejos se les puede asignar una función distinta en la vía general de oxidación. Dos componentes de la cadena transportadora de electrones, citocromo *c* y ubiquinona, no son parte de ninguno de los cuatro complejos. La ubiquinona existe como parte de una reserva de moléculas disueltas en la bicapa lipídica y el citocromo *c* es una proteína soluble en el espacio intermembranoso. Se cree que la ubiquinona y el citocromo *c* se mueven dentro o a lo largo de la membrana y emiten electrones entre los complejos proteicos grandes y relativamente inmóviles. Una vez dentro de alguno de estos complejos inmóviles, los electrones discurren a lo largo de trayectos definidos (del tipo ilustrado en la figura 5-16) entre los centros redox adyacentes cuyas posiciones relativas están fijas.

Cuando el NADH es el donante de electrones, éstos entran a la cadena respiratoria a través del complejo I, el cual transfiere electrones a la ubiquinona y genera ubiquinol (figs. 5-12 y 5-17). A diferencia del NADH, que puede difundirse lejos de estas deshidrogenasas solubles, $FADH_2$ permanece unido con un enlace covalente a la deshidrogenasa de succinato, un componente del complejo II. Cuando el donador es $FADH_2$, los electrones pasan de manera directa a la ubiquinona y evitan el paso por el extremo corriente arriba de la cadena, que tiene un potencial redox demasiado negativo para aceptar los electrones con menor energía del nucleótido de flavina (fig. 5-14).

Si se examinan los potenciales redox de los portadores sucesivos en la figura 5-14, resulta evidente que hay tres sitios en los que la transferencia de electrones se acompaña de una liberación notable de energía libre. Cada uno de estos *sitios de unión*, como se llaman, ocurre entre portadores que son parte de uno de los tres complejos, I, III y IV. La energía disponible, liberada cuando los electrones pasan por estos tres sitios, se conserva por la translocación de protones de la matriz a través de la membrana interna hacia el espacio intermembranoso. Estos tres complejos proteicos se describen a menudo como *bomba de protones*. Las translocaciones de protones por estos complejos transportadores de electrones establecen el gradiente de protones que impulsa la síntesis de ATP. La capacidad de estas máquinas moleculares notables para actuar como unidades independientes de translocación de protones puede demostrarse si se purifica cada una de ellas y se les incorpora de manera individual en vesículas artificiales de lípidos. Cuando se aporta un donante de electrones adecuado, estas vesículas junto con las proteínas son capaces de aceptar electrones y usar la energía liberada para bombear protones a través de la membrana de la vesícula (fig. 5-18).

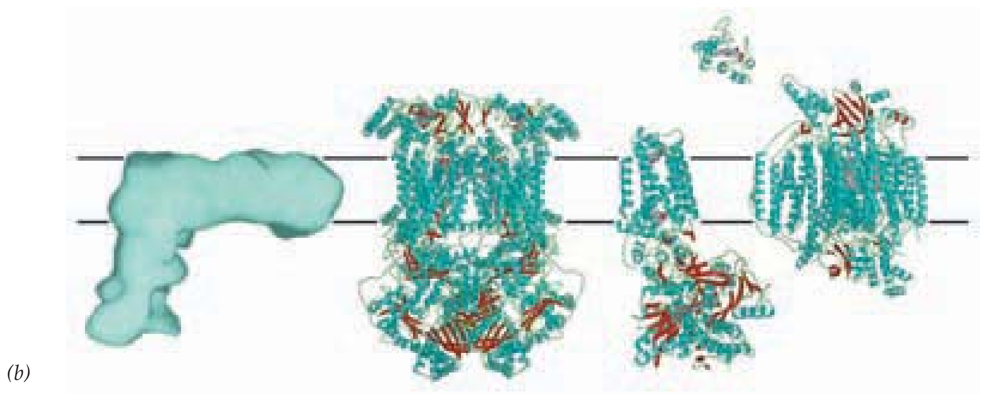
En los últimos años ha habido grandes avances en la descripción de la configuración molecular de todos los complejos proteicos de la membrana interna (fig. 5-17*b*). Los investigadores ya no se preguntan cómo se ven estas proteínas; más bien usan la abundante información estructural para comprender cómo funcionan. A continuación se analizan de forma breve las versiones que tienen los mamíferos de cada uno de estos complejos transportadores de electrones, que en conjunto contienen cerca de 70 polipéptidos diferentes. Las versiones bacterianas son mucho más sencillas que sus contrapartes en los mamíferos y contienen muchas menos subunidades. Las subunidades adicionales de los complejos de los mamíferos no poseen centros redox y se cree que funcionan en la regulación o ensamble del complejo y no en el transporte de electrones. En otras palabras, el proceso básico del transporte de electrones durante la respiración ha permanecido sin cambios desde su evolución hace miles de millones de años en los ancestros procariotas.

Complejo I (o *deshidrogenasa de NADH*). El complejo I es la puerta de entrada a la cadena transportadora de electrones y cataliza la transferencia de un par de electrones de NADH a la ubiquinona (UC) para formar ubiquinol (UCH_2). La versión de los mamíferos del complejo I es un conglomerado enorme con forma de L que contiene por lo menos 45 subunidades diferentes y representa una masa molecular cercana a un millón de daltones. Siete de las subunidades, todos polipéptidos hidrófobos que cruzan la membrana, se codifican por genes mitocondriales



Subunidades	Complejo I Deshidrogenasa de NADH mamíferos	Complejo III Citocromo bc_1	Complejo II Deshidrogenasa de succinato	Complejo IV Oxidasa de citocromo *c*
mtDNA	7	1	0	3
nDNA	39	10	4	10
TOTAL	46	11	4	13
Masa molecular (Da)	>900 000	~240 000	~125 000	~200 000

(a)



(b)

FIGURA 5-17 Cadena transportadora de electrones de la membrana mitocondrial interna. *a*) La cadena respiratoria consiste en cuatro complejos de portadores de electrones y dos portadores más (ubiquinona y citocromo *c*) que se disponen de manera independiente. Los electrones entran a la cadena a partir de NADH (mediante el complejo I) o $FADH_2$ (una parte del complejo II). Los electrones pasan del complejo I o II a la ubiquinona (UQ), la cual existe como una reserva dentro de la bicapa de lípidos. Luego, los electrones pasan de la ubiquinona reducida (ubiquinol) al complejo III y después al citocromo *c* proteico periférico, que al parecer es móvil. Los electrones se transfieren del citocromo *c* al complejo IV (oxidasa de citocromo) y después al O_2 para formar H_2O. Se indican los sitios de translocación de protones de la matriz al citosol. El número preciso de protones translocados a cada sitio aún es motivo de controversia; el número indicado es un consenso general. Hay que tener presente que las cantidades de protones que se muestran son las generadas por cada par de electrones transportados, suficientes para reducir sólo la mitad de una molécula de O_2. (La translocación de protones por el complejo III ocurre mediante un ciclo Q, cuyos detalles se muestran en la figura 4 de la sección Vías experimentales. El ciclo Q puede dividirse en dos pasos, cada uno de los cuales conduce a la liberación de dos protones hacia el citosol.) *b*) Estructuras de los componentes proteicos de la cadena transportadora de electrones (versión mitocondrial o bacteriana). Aún se desconoce la estructura terciaria del complejo I, pero se indica su forma general. (*B*, TOMADA DE BRIAN E. SCHULTZ Y SUNNEY I. CHAN, REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE AN REV BIOP BIOMOL STRUC, VOL. 30. © 2001, ANNUAL REVIEWS, INC.)

y son homólogos de los polipéptidos bacterianos. Como se indica en la figura 5-17*b*, el complejo I es el único miembro de la cadena transportadora de electrones cuya estructura tridimensional aún no se ha resuelto por cristalografía por rayos X hasta el momento en que se escribió esta obra. El complejo I incluye una flavoproteína con FMN que oxida al NADH, por lo menos siete centros de hierro-azufre distintos y dos moléculas unidas de ubiquinona. Se cree que el paso de un par de electrones por

el complejo I se acompaña del movimiento de cuatro protones de la matriz hacia el espacio intermembranoso. La importancia de la disfunción del complejo I como causa de neurodegeneración se considera en la página 209.

Complejo II (o *deshidrogenasa de succinato*). El complejo II consiste en cuatro polipéptidos: dos subunidades hidrófobas que fijan la proteína a la membrana y dos subunidades hidrofílicas que comprenden la enzima del ciclo del ATC deshidrogenasa de succinato. El complejo II suministra una vía para alimentar los electrones de baja energía (los cercanos a 0 mV) del succinato a FAD y ubiquinona (figs. 5-14 y 5-17). El trayecto de $FADH_2$ en el sitio catalítico a la ubiquinona mueve a los electrones una distancia de 40 Å a través de tres cúmulos diferentes de hierro-azufre. El complejo II también contiene un grupo hemo, el cual se piensa que atrae a los electrones escapados, lo que previene que se formen radicales superóxido destructivos (pág. 34). La transferencia de electrones a través del complejo II no se realiza por translocación de protones.

Complejo III (o *citocromo* bc_1). El complejo III cataliza la transferencia de electrones del ubiquinol al citocromo *c*. Las evaluaciones experimentales sugieren que se bombean cuatro protones a través de la membrana por cada par de electrones que se transfiere por el complejo III. Los protones se liberan hacia el espacio intermembranoso en dos pasos separados impulsados por la energía que se libera cuando dos electrones se separan entre sí y pasan por diferentes vías a través del complejo. Dos protones provienen de la molécula de ubiquinol que ingresó al complejo. Dos protones más se retiran de la matriz y se trasladan a través de la membrana como parte de una segunda molécula de ubiquinol. Estos pasos se describen con más detalle en la figura 4 de la sección Vías experimentales, que puede encontrarse en Internet en la siguiente dirección: *www.wiley.com/college/karp*. Tres de las subunidades del complejo III contienen grupos redox: el citocromo *b* posee dos moléculas hemo *b* con diferentes potenciales redox, citocromo c_1 y una proteína con hierro-azufre. El citocromo *b* es el único polipéptido del complejo que se codifica en un gen mitocondrial.

Complejo IV (u *oxidasa de citocromo c*). El paso final en el transporte de electrones en una mitocondria es la transferencia sucesiva de electrones del citocromo *c* reducido al oxígeno de acuerdo con la siguiente reacción:

$$2 \text{ cit } c^{2+} + 2 \text{ H}^+ + \tfrac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ cit } c^{3+} + \text{H}_2\text{O}$$

Para reducir una molécula de O_2:

$$4 \text{ cit } c^{2+} + 4 \text{ H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 4 \text{ cit } c^{3+} + 2 \text{ H}_2\text{O}$$

El complejo IV cataliza la reducción de O_2; este complejo es una enorme estructura de polipéptidos conocida como **oxidasa de citocromo**. La oxidasa de citocromo fue el primer componente de la cadena de transporte de electrones del que se mostró que actúa como bomba de protones. Esto se demostró con el experimento mostrado en la figura 5-18 en el que se incorporó la enzima purificada en vesículas que contienen una bicapa lipídica artificial (liposomas). La adición del citocromo *c* reducido al medio se acompañó de la expulsión de iones H^+ de las vesículas, lo cual se mide como la caída en el pH circundante. Ya sea dentro de un liposoma o en la membrana mitocondrial interna, la translocación de protones se suma a cambios de la conformación generados por la liberación de energía que acompaña a la transferencia de electrones. Se cree que por cada molécula de O_2 reducida por la oxidasa de citocromo se captan ocho protones de la matriz. Cuatro de estos protones se consumen en la formación de dos moléculas de agua, como se indicó antes; los otros cuatro protones se trasladan a través de la membrana y se liberan en el espacio intermembranoso (fig. 5-17). Por consiguiente, la reacción total puede escribirse así:

$$4 \text{ cit } c^{2+} + 8 \text{ H}^+_{(\text{matriz})} + \text{O}_2 \rightarrow 4 \text{ cit } c^{3+} + 2 \text{ H}_2\text{O} + 4 \text{ H}^+_{(\text{citosol})}$$

Los seres humanos producen unos 300 ml de "agua metabólica" mediante esta reacción al día. Se puede señalar que varios venenos respiratorios potentes, incluidos el monóxido de carbono (CO), azida (N_3^-) y cianuro (CN^-) ejercen su efecto tóxico mediante la unión con el sitio hemo a_3 de la oxidasa de citocromo. (El monóxido de carbono también se une con el grupo hemo de la hemoglobina.)

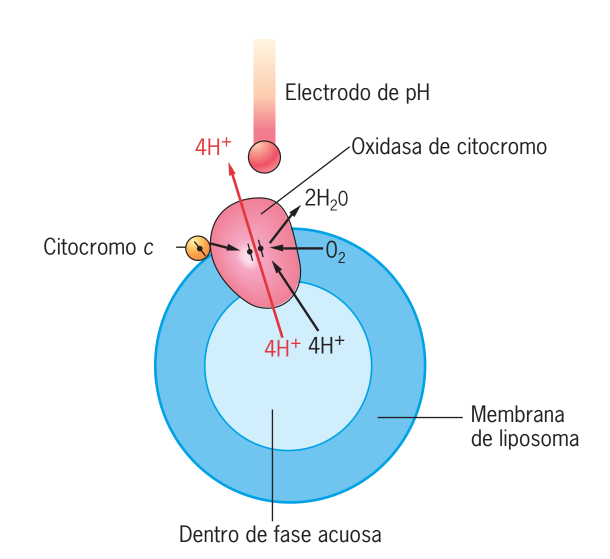


FIGURA 5-18 Demostración experimental de que la oxidasa de citocromo es una bomba de protones. Cuando la oxidasa de citocromo purificada se incorpora en la bicapa artificial de un liposoma, el medio se acidifica después de la adición de citocromo *c* reducido. Esto indica que cuando los electrones se transfieren del citocromo *c* a la oxidasa de citocromo y el O_2 se reduce hasta agua, los protones se trasladan del compartimiento dentro de la vesícula al medio externo. Mårten Wikström y colaboradores realizaron este experimento por primera vez en el decenio de 1960. (Reimpresa con autorización de M. I. Verkhovsky, et al. Nature 400:481, 1999. © 1999, Macmillan Magazines Limited.)

Una mirada más cercana a la oxidasa de citocromo

La oxidasa de citocromo consta de 13 subunidades, tres de las cuales son codificadas por el genoma mitocondrial y contienen los cuatro centros redox de la proteína. Se han realizado investigaciones intensivas sobre el mecanismo de transferencia de electrones a

través del complejo IV, sobre todo en los laboratorios de Mårten Wikström en la *Universidad de Helsinki*, Finlandia, y en el grupo de Gerald Babcock de la *Michigan State University.* Un desafío importante para los investigadores consiste en explicar cómo los portadores que son los únicos capaces de transferir electrones individuales pueden reducir una molécula de O_2 a dos moléculas de H_2O, un proceso que requiere cuatro electrones (junto con cuatro protones). Lo más importante es que el proceso debe ser muy eficiente porque la célula trata con sustancias muy peligrosas; la liberación "accidental" de las especies de oxígeno con reducción parcial puede dañar todas las macromoléculas de la célula (pág. 34).

El movimiento de electrones entre los centros redox de la oxidasa de citocromo se muestra en la figura 5-19. Los electrones se transfieren uno a la vez del citocromo *c* a través de un centro de cobre bimetálico (Cu_A) de la subunidad II a un hemo (hemo *a*) de la subunidad I. De ahí, los electrones se pasan a un centro redox localizado en la subunidad I que contiene un segundo hemo (*hemo* a_3) y otro átomo de cobre (Cu_B) situado a menos de 5 Å de distancia. La aceptación de los primeros dos electrones reduce el centro binuclear a_3–Cu_B de acuerdo con la siguiente reacción:

$$Fe^{3+}_{a_3} + Cu^{2+}_B + 2\,e^- \rightarrow Fe^{2+}_{a_3} + Cu^{1+}_B$$

Una vez que el centro binuclear acepta su segundo electrón, una molécula de O_2 se une con el centro. El doble enlace O═O se rompe entonces, cuando los átomos de oxígeno aceptan un par de electrones del centro binuclear a_3-Cu_B reducido, es cuando se forma un anión peroxi reactivo O_2^{2-}.

$$Fe^{2+}—O{=}O\ Cu^{1+} \rightarrow Fe^{3+}—O^-{—}O^-\ Cu^{2+}$$

El ion peroxi es el componente con mayor energía en la secuencia de reacción y reacciona con rapidez para extraer un tercer electrón, ya sea del hemo mismo o de un residuo de aminoácido cercano. Al mismo tiempo, el centro binuclear acepta dos protones de la matriz, lo que separa el enlace covalente O—O y reduce uno de los átomos de oxígeno.

$$Fe^{4+}{=}O^{2-} \qquad Cu^{2+}—OH_2$$

El paso de un cuarto electrón y la entrada de dos protones adicionales de la matriz permiten la formación de dos moléculas de agua:

$$Fe^{3+} + Cu^{2-} + 2\,H_2O$$

Por cada protón que se retira de la matriz, queda un exceso de carga negativa (en forma de un OH^-), lo que contribuye en forma directa al gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna.

Como se mencionó antes, los protones captados de la matriz se utilizan de dos formas muy distintas. Por cada molécula de O_2 que se reduce a 2 H_2O por acción de la oxidasa de citocromo: a) se consumen cuatro iones H^+ en esta reacción química y b) cuatro iones H^+ adicionales se trasladan a través de la membrana mitocondrial interna. Los primeros cuatro protones pueden denominarse protones de "sustrato" y los últimos cuatro como protones "bombeados". El movimiento de ambos grupos de protones contribuye al gradiente electroquímico a través de la membrana.

Con la publicación de la estructura cristalina tridimensional de la oxidasa de citocromo se pudieron buscar las vías a través de las cuales podrían moverse los protones de sustrato y los bombeados por la enorme proteína. A diferencia de otros iones (p. ej., Na^+ o Cl^-) que deben difundirse por sí solos toda la distancia que cruzan, los iones H^+ pueden "saltar" por un canal cuando se intercambian con otros protones presentes a lo largo del trayecto. Estas vías conductoras de protones (o "cables de protones") pueden identificarse porque constituyen cuerdas de residuos ácidos, residuos con enlaces de hidrógeno y moléculas de agua atrapadas. Los investigadores ya identificaron posibles conductos de protones dentro de la molécula, pero su papel aún no se confirma de manera experimental. Por desgracia, los modelos estructurales estáticos no pueden revelar por sí mismos

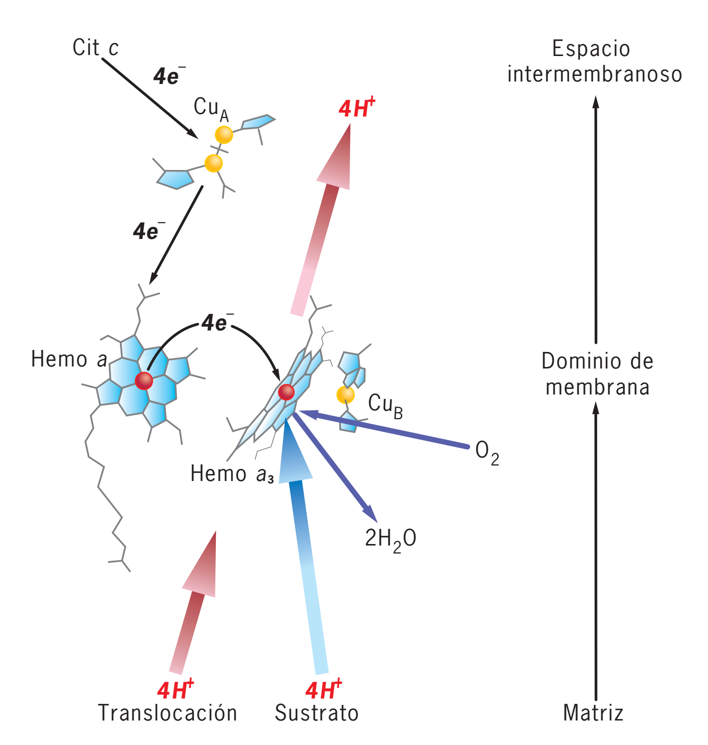


FIGURA 5-19 Mecanismo de acción de la oxidasa de citocromo. Modelo que muestra el flujo de electrones por los cuatro centros redox de la oxidasa de citocromo. Los átomos de hierro se muestran como esferas rojas, los de cobre como esferas amarillas. Se cree que los electrones pasan uno a la vez del citocromo *c* al centro dimérico de cobre (Cu_A), luego al grupo hemo (Fe_a) del citocromo *a*, después al centro redox binuclear formado por un segundo hierro (del grupo hemo del citocromo a_3) y un ion cobre (Cu_B). Se indican las estructuras y las orientaciones sugeridas de los centros redox. (TOMADA DE M. WIKSTRÖM, ET AL., BIOCHIM BIOPHYS ACTA 1459:515, 2000.)

los movimientos dinámicos que ocurren dentro de la proteína durante su función. Es probable que la energía liberada por la reducción de O_2 se utilice para impulsar los cambios en la conformación que alteran los estados de ionización y localizaciones precisas de las cadenas laterales de los aminoácidos dentro de estos canales. A su vez, estos cambios promoverían el movimiento de iones H^+ a través de la proteína.

REVISIÓN ?

1. Describa los pasos por los cuales el transporte de electrones por la cadena respiratoria conduce a la formación de un gradiente de protones.
2. De los cinco tipos de portadores de electrones, ¿cuál tiene la menor masa molecular?, ¿cuál posee la mayor proporción entre átomos de hierro y electrones transportados?, ¿cuál tiene un componente que se localiza fuera de la bicapa lipídica?, ¿cuál es capaz de aceptar protones y electrones y cuál sólo acepta electrones?
3. Describa la relación entre la afinidad de un compuesto por los electrones y su capacidad para actuar como agente reductor. ¿Cuál es la relación entre el potencial para transferencia de electrones de un agente reductor y la capacidad del otro miembro de esa pareja para actuar como agente oxidante?
4. Observe la figura 5-12 y describa en qué son similares los estados de semiquinona de la ubiquinona y FMN.
5. ¿A qué se refiere el centro binuclear de la oxidasa de citocromo?, ¿cómo funciona en la reducción de O_2?
6. ¿Cuáles son las dos maneras distintas en las que la oxidasa de citocromo contribuye al gradiente de protones?
7. ¿Por qué algunas transferencias de electrones producen una mayor liberación de energía que otras?

5.4 TRANSLOCACIÓN DE PROTONES Y ESTABLECIMIENTO DE UNA FUERZA MOTRIZ PARA PROTONES

Ya se mencionó que la energía libre producida durante el transporte de electrones se utiliza para mover protones de la matriz hacia el espacio intermembranoso y el citosol. La translocación de protones a través de la membrana interna es electrogénica (esto es, que produce voltaje) porque aumenta la cantidad de cargas positivas en el espacio intermembranoso y el citosol, así como una mayor cantidad de cargas negativas dentro de la matriz. Por lo tanto, hay dos componentes del gradiente de protones que deben considerarse. Uno de ellos es la diferencia en la concentración de iones hidrógeno entre un lado de la membrana y el otro, es decir, un gradiente de pH (**ΔpH**). El otro componente es el voltaje (ψ) que se produce por la separación de carga a través de la membrana. Un gradiente que tiene un componente de concentración (químico) y otro eléctrico (voltaje) es un *gradiente electroquímico* (pág. 148). La energía presente en ambos componentes del gradiente electroquímico puede combinarse y expresarse como **fuerza motriz de protones (Δp)**, que se mide en milivoltios. En consecuencia;

$$\Delta p = \psi - 2.3\ (RT/F)\ \Delta pH$$

Como 2.3 *RT/F* es igual a 59 mV a 25°C, la ecuación[3] puede escribirse como sigue:

$$\Delta p = \psi - 59\ \Delta pH$$

La contribución del potencial eléctrico a la fuerza motriz de protones comparada con la contribución que hace el gradiente de pH depende de las propiedades de permeabilidad de la membrana interna. Por ejemplo, si el movimiento de protones hacia el exterior durante el transporte de electrones se acompaña de iones cloro con carga negativa, el potencial eléctrico (ψ) se reduce sin afectar el gradiente de protones (ΔpH). Las mediciones que se han realizado en varios laboratorios sugieren que las mitocondrias con actividad respiratoria generan una fuerza motriz de protones cercana a 220 mV a través de su membrana interna. En las mitocondrias de los mamíferos, cerca de 80% de la energía libre de Δp está representado por el componente de voltaje y el otro 20% por la diferencia en la concentración de protones (alrededor de 0.5 a una unidad de pH de diferencia). Si la diferencia en la concentración de protones fuera mucho mayor que esto, es probable que afectara la actividad de las enzimas citoplásmicas. El voltaje transmembranoso a través de la membrana mitocondrial interna puede visualizarse con tintes liposolubles de carga positiva que se distribuyen a través de las membranas en proporción con el potencial eléctrico (fig. 5-20).

Cuando las células se tratan con cierto tipo de agentes liposolubles, en particular 2,4-dinitrofenol (DNP), continúan la oxidación de sustratos sin poder generar ATP. En otras palabras, el DNP *disocia* la oxidación de la glucosa y la fosforilación del ADP. Gracias a esta propiedad, el DNP se utiliza bastante en el laboratorio para inhibir la formación de ATP. Durante el decenio de 1920, unos cuantos médicos prescribían DNP como agente para reducir el peso corporal. Cuando se exponen a este fármaco, las células de los pacientes obesos continúan la oxidación de sus reservas de grasa en un intento vano para mantener los niveles normales de ATP. La práctica cesó por las muertes de varios pacientes que ingirieron el fármaco. Con la formulación de la teoría quimioosmótica y la confirmación de que las mitocondrias generan un gradiente de protones, se comprendió el mecanismo de la acción del DNP. Este agente disocia la oxidación y la fosforilación porque se combina con protones y, debido a su solubilidad en lípidos, transporta protones a tra-

[3] En otras palabras, una diferencia de una unidad de pH, que representa una diferencia de 10 veces en la concentración de H^+ a través de la membrana, equivale a una diferencia en el potencial de 59 milivoltios, equivalente a una diferencia de energía libre de 1.37 kcal/mol.

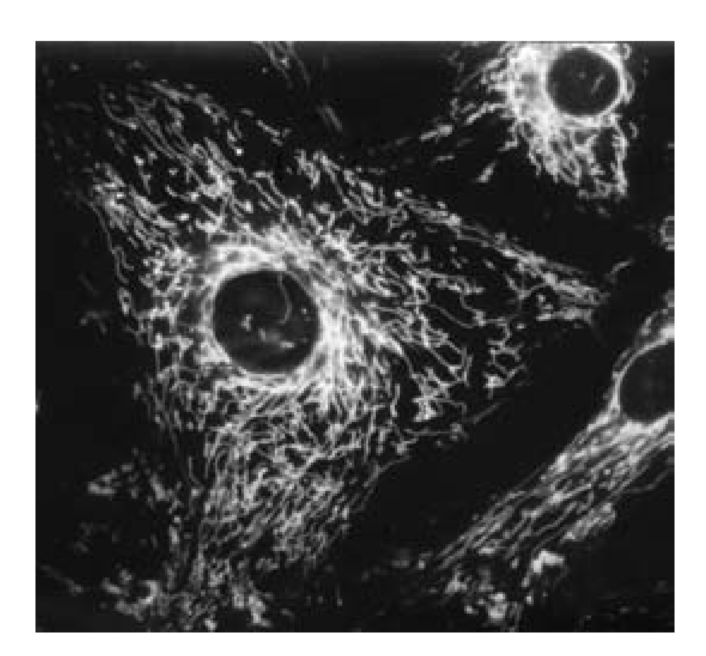


FIGURA 5-20 **Visualización de la fuerza motriz de protones.** Micrografía fluorescente de una célula cultivada teñida con el compuesto fluorescente catiónico rodamina. Cuando la célula está activa, el voltaje generado a través de la membrana interna (interior negativo) da lugar a la acumulación de la sustancia liposoluble dentro de las mitocondrias, lo que hace que estos organelos emitan fluorescencia. (Tomada de L. V. Johnson, et al., J. Cell Biol. 88:528, 1981, cortesía de Lan Bo Chen, con autorización del titular del copyright, The Rockefeller University Press.)

vés de la membrana mitocondrial interna en favor del gradiente electroquímico.

Para que se mantenga una fuerza motriz de protones es necesario que la membrana mitocondrial interna permanezca muy impermeable a los protones. De lo contrario, el gradiente establecido por el transporte de electrones se disipa en poco tiempo por el escape de protones de regreso a la matriz, lo que conduce a la liberación de energía en forma de calor. Resultó sorprendente descubrir que la membrana mitocondrial interna de ciertas células contiene proteínas que actúan como desacopladores naturales (endógenos). Estas proteínas, llamadas proteínas de desacoplamiento (o UCP, del inglés *uncoupling proteins*), son muy abundantes en el tejido adiposo pardo de los mamíferos, que funciona como fuente de producción de calor durante la exposición a bajas temperaturas. Los seres humanos lactantes también dependen de depósitos de grasa parda para mantener la temperatura corporal. Estas células de grasa parda desaparecen en su mayoría cuando crecemos, lo cual nos hace dependientes de la contracción muscular (al tiritar de frío) para generar calor corporal. La UCP1 es el centro de atención de varias compañías farmacéuticas que esperan desarrollar productos que estimulen esta proteína como parte de un régimen de pérdida de peso. Otras isoformas de UCP (UCP2 a UCP5) se encuentran en varios tejidos, en especial en células del sistema nervioso, pero sus funciones son tema de controversia. Conforme a una hipótesis, las UCP presentes en la membrana mitocondrial interna impiden la acumulación de una fuerza protomotriz excesivamente grande. Si tal estado de alta energía se creara podría bloquear el paso de electrones a través de los complejos respiratorios, causando el escape de electrones y la producción de radicales de oxígeno reactivos.

Los experimentos que permitieron la aceptación de la fuerza motriz de protones como un intermediario en la formación de ATP se describen en la sección Vías experimentales, que puede encontrarse en *www.wiley.com/college/karp* en Internet.

REVISIÓN ?

1. ¿Cuáles son los dos componentes de la fuerza motriz de protones y cómo varía su contribución relativa de una célula a otra?
2. ¿Cuál es el efecto del dinitrofenol en la formación de ATP en las mitocondrias?, ¿por qué?

5.5 LOS MECANISMOS PARA LA FORMACIÓN DE ATP

Ahora que se describió la forma en que el transporte de electrones genera un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna, se puede tratar la maquinaria que utiliza la energía almacenada en este gradiente para impulsar la fosforilación del dinucleótido de adenina.

A principios del decenio de 1960, Humberto Fernandez-Moran, del *Massachussetts General Hospital* examinó mitocondrias aisladas con la técnica para entonces nueva de tinción negativa. Fernandez-Moran descubrió una capa de esferas unidas a la cara interna (matriz) de la membrana interna que sobresalían de la membrana y se unían a ésta mediante tallos (fig. 5-21). Unos

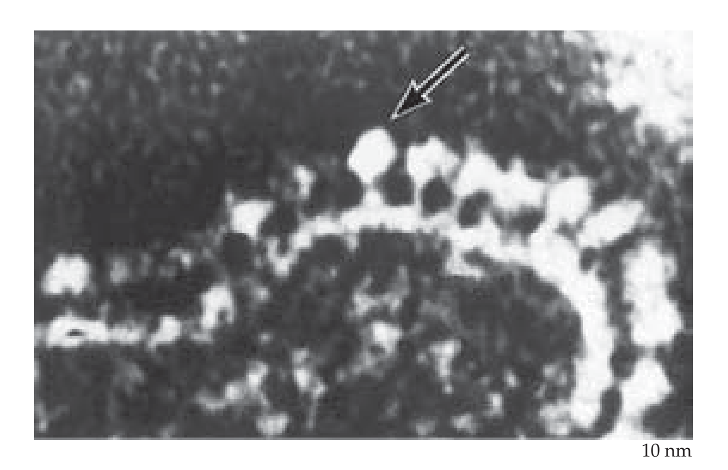


FIGURA 5-21 **Mecanismos para la síntesis del ATP.** Micrografía electrónica de una pequeña porción de una mitocondria de corazón bovino secada al aire y con tinción negativa. En las magnificaciones cercanas a medio millón se ven partículas esféricas (flecha) unidas mediante un tallo delgado a la superficie interna de las membranas de las crestas. (Tomada de Humberto Fernandez-Moran, et al., J Cell Biol 22:73, 1964; con autorización de los derechos reservados de Rockefeller University Press.)

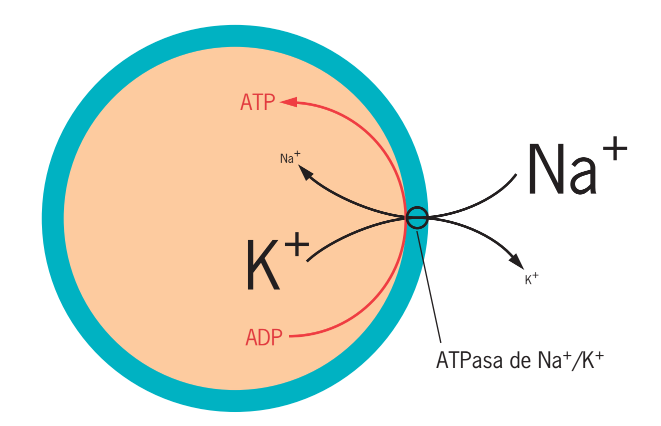


FIGURA 5-22 **Un experimento para impulsar la formación de ATP en las vesículas de membrana reconstituidas con la ATP-asa de Na^+/K^+.** Al hacer que estas vesículas tengan una concentración interna muy alta de K^+ y concentración externa muy elevada de Na^+, se favorece que la reacción funcione en sentido contrario al que ocurre en condiciones normales en la membrana plasmática. En el proceso se forma ATP a partir de ADP y P_i. El tamaño de las letras indica la dirección de los gradientes de concentración.

cuantos años después, Efraim Racker de la *Cornell University* aisló las esferas de la membrana interna, a las que llamó *factor de unión 1*, o tan sólo F_1. Racker descubrió que las esferas F_1 se comportaban como una enzima que hidroliza el ATP, es decir, una ATP-asa. A primera vista, parece un hallazgo peculiar. ¿Por qué tendrían las mitocondrias una enzima predominante que hidroliza la sustancia que se supone producen?

Si se considera que la hidrólisis del ATP es la reacción inversa a su formación, la función de las esferas F_1 se torna más evidente; contiene el sitio catalítico en el que ocurre normalmente la formación de ATP. Hay que recordar lo siguiente:

1. Las enzimas no afectan la constante de equilibrio de la reacción que catalizan.
2. Las enzimas son capaces de catalizar las reacciones en un sentido y en el contrario.

Por consiguiente, la dirección de una reacción catalizada por enzimas en un momento determinado depende de las condiciones prevalecientes. Esto se demuestra bien en los experimentos con otras ATP-asas, como la ATP-asa de Na^+/K^+ de la membrana plasmática (pág. 157). Cuando se trató esta enzima en el capítulo 4, se describió como una enzima que utiliza la energía obtenida de la hidrólisis del ATP para exportar Na^+ e importar K^+ contra sus gradientes respectivos. En la célula, esta es la única función de la enzima. Sin embargo, en condiciones experimentales, esta enzima puede catalizar la formación de ATP en lugar de la hidrólisis (fig. 5-22). Para obtener tales condiciones, se prepararon fantasmas de eritrocitos (pág. 144) con una concentración interna de K^+ *muy* alta y una concentración externa de Na^+ *muy* alta, mayores a las existentes en el cuerpo. En estas condiciones, el K^+ sale de la "célula" y el Na^+ ingresa a la "célula". Ambos iones se mueven en favor de sus gradientes respectivos, en lugar del sentido opuesto, como sucedería en condiciones normales en una célula viva. Si existen ADP y P_i en el fantasma celular, el movimiento de iones induce la síntesis de ATP en lugar de la hidrólisis. Los experimentos como éste ilustran la realidad de lo que podría esperarse con base en la reversibilidad teórica de las reacciones catalizadas por enzimas. También ejemplifican la manera en que puede usarse un gradiente iónico para impulsar una reacción en la que el ADP se fosforila hasta ATP, que es lo que ocurre en la mitocondria. La fuerza de impulso es la fuerza motriz de protones establecida por el transporte de electrones.

La estructura de la sintetasa de ATP

Aunque la esfera F_1 es la porción catalítica de la enzima que produce el ATP en la mitocondria, esto no es una descripción completa. La enzima productora de ATP, la **sintetasa de ATP**, es un complejo proteico en forma de hongo (fig. 5-23*a*) conformado por dos componentes principales: una cabeza F_1 esférica (de unos 90 Å de diámetro) y una sección basal, llamada F_0, incrustada en la membrana interna. Las micrografías electrónicas de alta resolución revelan que las dos porciones se conectan mediante un tallo central y uno periférico como se muestra en la figura 5-23*b*. Una mitocondria típica del hígado de un mamífero tiene apenas 15 000 copias de la sintetasa de ATP. Existen versiones homólogas de la sintetasa de ATP en la membrana plasmática de las bacterias, en la membrana tilacoide de los cloroplastos vegetales y en la membrana interna de las mitocondrias.

Las porciones F_1 de las sintetasas de ATP bacteriana y mitocondrial están muy conservadas; ambas contienen cinco polipéptidos diferentes con una estequiometría de $\alpha_3\beta_3\delta\gamma\epsilon$. Las subunidades alfa y beta se disponen en forma alternada dentro de la cabeza de F_1 de modo que se parecen a los gajos de una naranja (fig. 5-23*b*; véase también 5-26*b*). Se pueden señalar dos aspectos para una discusión posterior: a) cada F_1 posee tres sitios catalíticos para la síntesis de ATP, uno en cada subunidad beta, y b) la subunidad gamma se extiende desde la punta exterior de la cabeza de F_1 por el tallo central y hace contacto con la porción basal F_0. En la enzima mitocondrial, los cinco polipéptidos de F_1 están codificados por el DNA nuclear, sintetizado en el citosol, y se importa después de la traducción (véase fig. 8-47).

La porción F_0 de la sintetasa de ATP reside dentro de la membrana y consiste en tres polipéptidos diferentes con una estequiometría de ab_2c_{10-14} (fig. 5-23*b*). El número de subunidades en el anillo *c* se escribe como 10-14 porque los estudios estructurales revelan que este número varía según sea la fuente de la enzima. Por ejemplo, la sintetasa de ATP, tanto de las mitocondrias de levaduras como de *E. coli*, tiene 10 subunidades *c*, en tanto que ya se demostró que una enzima de cloroplasto posee 14 de ellas (fig. 5-24). La base F_0 contiene un canal por el cual se conducen los protones desde el espacio intermembranoso a la matriz. La presencia de un canal transmembranoso se descubrió en experimentos en los que la membrana mitocondrial interna se rompió en fragmentos que forman vesículas de membrana, llamadas *partículas submitocondriales* (fig. 5-25*a*). Las partículas submitocondriales intactas, que contienen la sintetasa de ATP incrustada en la membrana de la vesícula, son capaces de oxidar sustratos, generar un gradiente de protones y sintetizar ATP (fig. 5-25*b*). Sin embargo, si se retiran las esferas F_1 de las

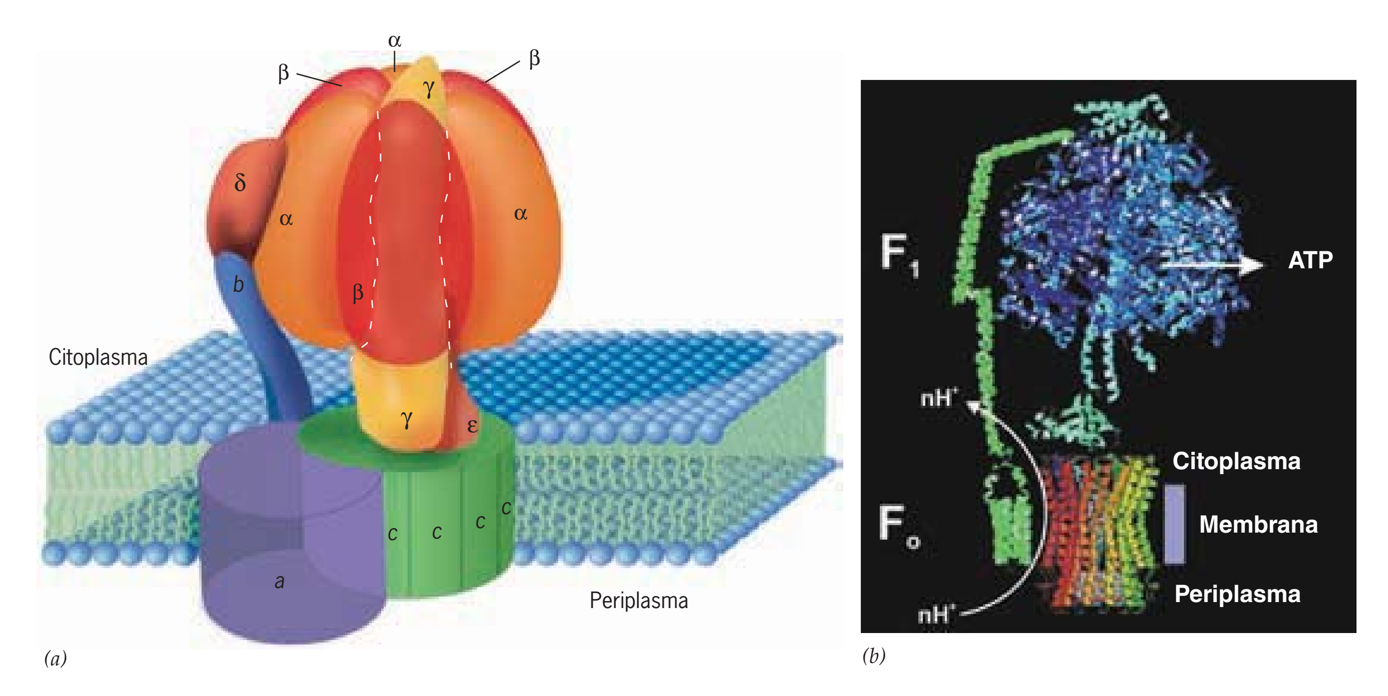


FIGURA 5-23 **Estructura de la sintetasa de ATP.** *a*) Representación esquemática de la sintetasa de ATP bacteriana. La enzima consiste en dos porciones principales llamadas F_1 y F_0. La cabeza F_1 posee cinco subunidades diferentes en proporciones de 3α:3β:1δ:1γ:1ε. Las subunidades alfa y beta se organizan en un círculo para formar la cabeza esférica de la partícula; la subunidad gamma discurre por el centro de la sintetasa de ATP, desde la punta de F_1 hasta F_0 para formar el tallo central; la subunidad épsilon ayuda a unir la subunidad gamma con la base F_0. La base F_0, que está incrustada en la membrana, tiene tres subunidades diferentes con una proporción aparente 1*a*:2*b*:10-14*c*. Como se explica más adelante, se piensa que las subunidades *c* forman un anillo giratorio dentro de la membrana; las subunidades *b* pares de la base F_0 y la subunidad delta de la cabeza F_1 forman un tallo periférico que sujeta las subunidades α/β en una posición fija y la subunidad *a* contiene el canal de protones que permite que éstos crucen la membrana. La enzima de los mamíferos incluye siete a nueve pequeñas subunidades más cuyas funciones aún se desconocen. *b*) Estructura tridimensional de la sintetasa de ATP bacteriana. Esta imagen está compuesta de varias estructuras parciales de la enzima de diversos organismos. Puede verse una animación de la enzima en www.biologie.uni-osnabrueck.de/biophysik/junge. (*B*, TOMADA DE WOLFGANG JUNGE Y NATHAN NELSON, REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE SCIENCE 308:643, 2005. COPYRIGHT 2005, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE.)

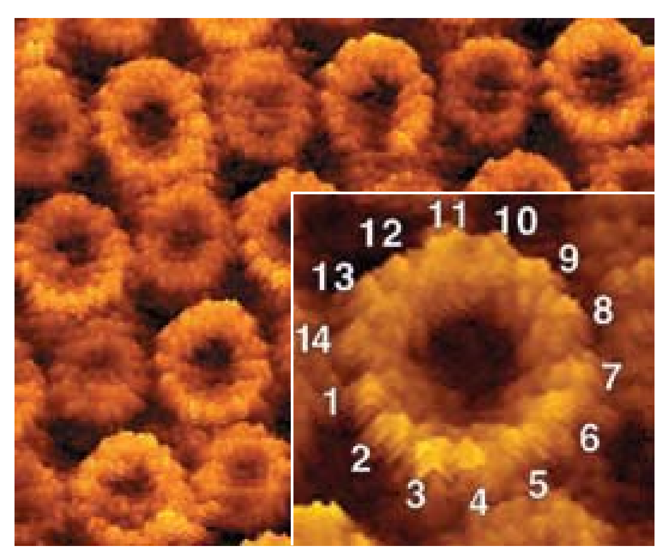


FIGURA 5-24 **Visualización del anillo *c* oligomérico de la sintetasa de ATP de un cloroplasto.** Microscopia con fuerza atómica de un "campo" de anillos *c* aislados de las sintetasas de ATP del cloroplasto y reconstituidos como estructura bidimensional dentro de una bicapa lipídica artificial. Existen anillos de dos diámetros diferentes en el campo, tal vez porque los oligómeros se encuentran en las dos orientaciones posibles dentro de la "membrana artificial" (*recuadro*). La vista de mayor resolución de uno de los anillos muestra que está formado por 14 subunidades. (REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE HOLGER SEELERT, ET AL., CORTESÍA DE DANIEL J. MÜLLER Y ANDREAS ENGEL, NATURE 405:419, 2000. © 2000, MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)

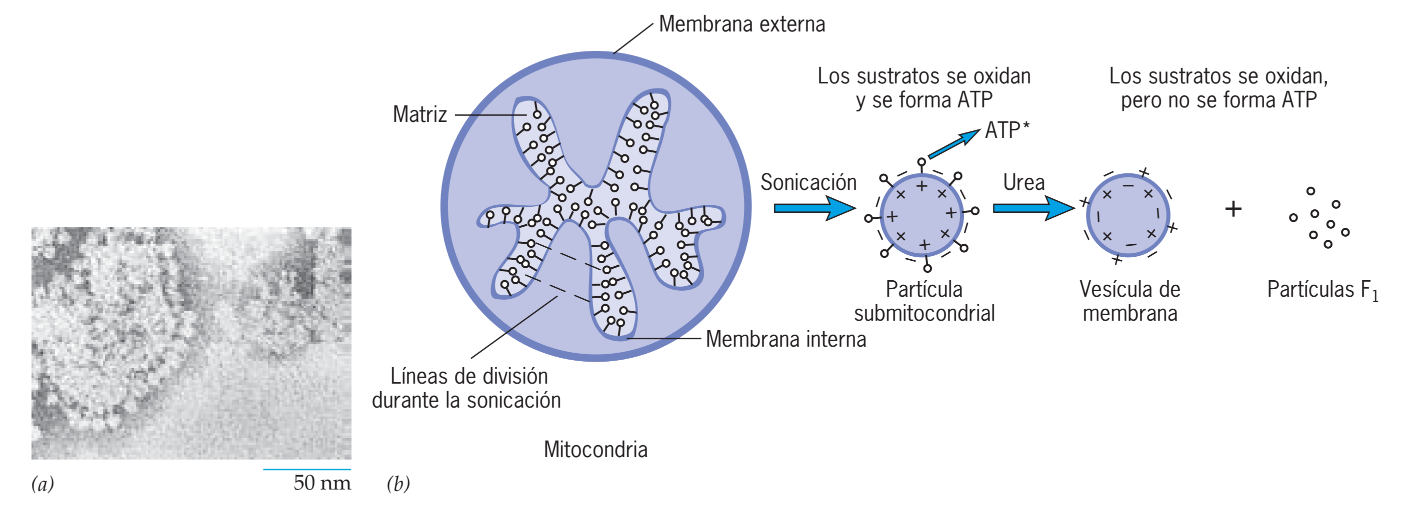


FIGURA 5-25 Formación de ATP en experimentos con partículas submitocondriales. *a*) Micrografía electrónica de partículas submitocondriales que son fragmentos de la membrana mitocondrial interna y se volvieron vesículas cerradas con las esferas F_1 sobresalientes hacia el medio. *b*) Esbozo de un experimento que muestra que las partículas submitocondriales intactas son capaces de realizar la oxidación de sustrato, la formación de un gradiente de protones (indicado por la separación de cargas a través de la membrana) y la formación de ATP. En contraste, las partículas submitocondriales que carecen de la cabeza F_1 son capaces de oxidación del sustrato, pero no de mantener un gradiente de protones (indicado por la falta de separación de cargas), por lo que son incapaces de formar ATP. (*A*, CORTESÍA DE EFRAIM RACKER.)

partículas, la membrana de la vesícula ya no puede mantener un gradiente de protones a pesar de continuar la oxidación de sustrato y el transporte de electrones. Los protones que se trasladan a través de la membrana durante el transporte de electrones tan sólo cruzan de regreso por la sintetasa de ATP "decapitada" y la energía se disipa.

La base de la formación de ATP de acuerdo con el mecanismo de cambio de unión

¿Cómo es que el gradiente electroquímico de un protón proporciona la energía necesaria para impulsar la síntesis de ATP? Para responder esta pregunta, Paul Boyer de la *UCLA* publicó una hipótesis innovadora en 1979 denominada *mecanismo de cambio de unión*, que ha ganado gran aceptación desde entonces. En general, la hipótesis del cambio de unión tiene varios elementos distintos que se describen en secuencia.

1. **La energía liberada con el movimiento del protón no se usa para impulsar la fosforilación del ADP en forma directa, sino que se emplea en cambiar la afinidad de unión del sitio activo por el producto ATP.** Se suele pensar que las reacciones químicas ocurren en un ambiente acuoso en el que la concentración de agua es 55 M y los reactivos y productos simplemente están disueltos en el medio. En estas condiciones, se requiere energía para impulsar la formación de enlaces covalentes entre el ADP y el fosfato inorgánico para formar ATP. Sin embargo, ya se demostró que una vez que el ADP y el P_i se unen dentro del sitio catalítico de la sintetasa de ATP, los dos reactivos se condensan con facilidad para formar una molécula de ATP unida con firmeza sin el ingreso de energía adicional. En otras palabras, aunque la siguiente reacción:

$$\text{ADP soluble} + P_i \text{ soluble} \rightarrow \text{ATP soluble} + H_2O$$

puede requerir el ingreso de una cantidad considerable de energía (7.3 kcal/mol en condiciones estándar), la reacción:

$$\text{ADP unido a enzima} + P_i \text{ unido a enzima} \rightarrow \text{ATP unido a enzima} + H_2O$$

tiene una constante de equilibrio cercana a uno ($\Delta G^\circ = 0$), por lo que puede ocurrir en forma espontánea sin el ingreso de energía (pág. 90). Esto no significa que el ATP pueda formarse del ADP sin gasto energético, sino que se requiere energía para la liberación del producto que está unido con fuerza al sitio catalítico y no para el fenómeno mismo de fosforilación.

2. **Cada sitio activo progresa de manera sucesiva por tres diferentes conformaciones con afinidades distintas por los sustratos y los productos.** Recuérdese que el complejo F_1 tiene tres sitios catalíticos, uno en cada una de las tres subunidades beta. Cuando los investigadores examinaron las propiedades de los tres sitios catalíticos en una enzima *estática* (una que no participaba en el recambio enzimático), los tres sitios mostraron diferentes propiedades químicas. Boyer propuso que, en cualquier momento, los tres sitios catalíticos están presentes en conformaciones diferentes, lo cual hace que tengan distintas afinidades por los nucleótidos. En cualquier instante, un sitio está en la conformación "laxa" o L, en la que el ADP y el P_i están

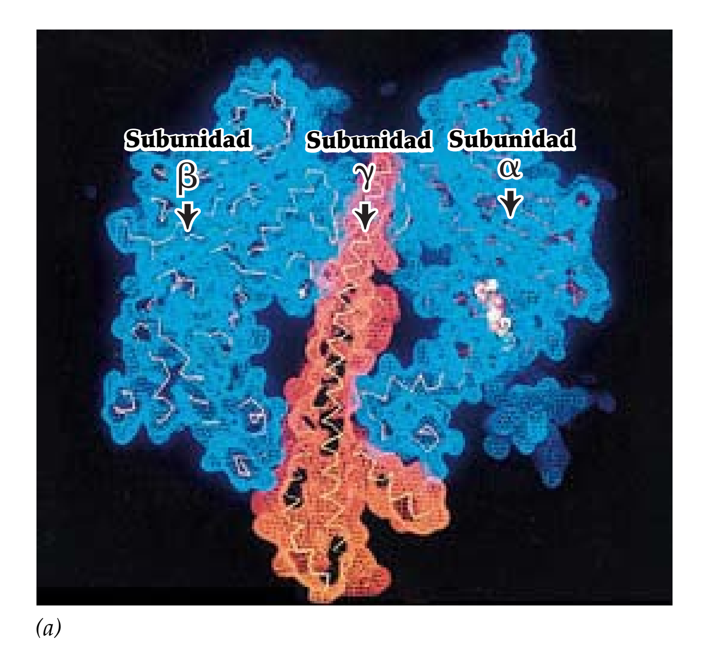
unidos con soltura; un segundo sitio está en la conformación "ajustada" o T, en la que los nucleótidos (sustratos ADP + P_i o producto ATP) están unidos con fuerza, y el tercer sitio está en la conformación "abierta" u O, que permite la liberación del ATP porque posee una afinidad muy baja por los nucleótidos.

Aunque había diferencias entre los tres sitios catalíticos en una enzima estática, Boyer obtuvo evidencia de que todas las moléculas de ATP producidas por una enzima activa se sintetizaban por el mismo mecanismo catalítico. En otras palabras, parecía que los tres sitios catalíticos de la enzima operaban de manera idéntica. Para explicar la contradicción aparente entre la asimetría de la estructura enzimática y la uniformidad de su mecanismo catalítico, Boyer propuso que cada uno de los tres sitios catalíticos pasaba de manera secuencial por las mismas conformaciones L, T y O (véase fig. 5-27).

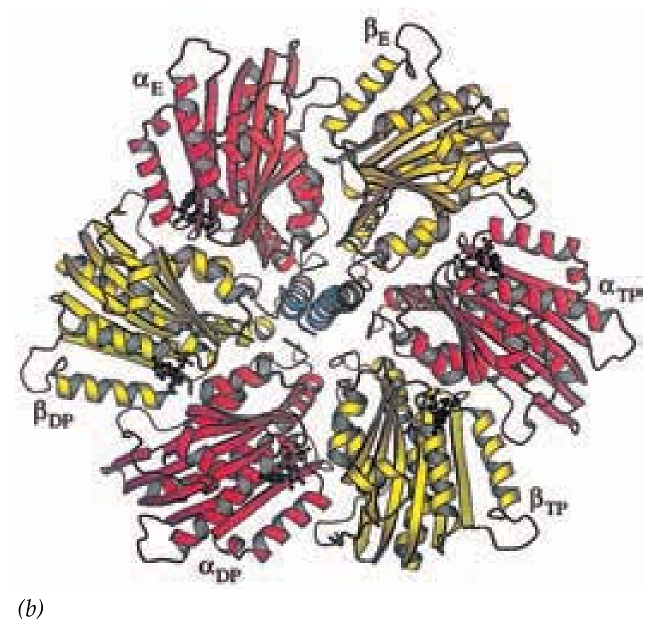
3. El ATP se sintetiza por catálisis rotatoria, en la que una parte de la sintetasa de ATP rota en relación con otra parte. Para explicar los cambios secuenciales en la conformación de cada uno de los sitios catalíticos, Boyer propuso que las subunidades alfa y beta, que forman un anillo hexagonal de subunidades dentro de la cabeza F_1 (fig. 5-23), giran *en relación* con el tallo central. En este modelo, que se conoce como *catálisis rotatoria,* la rotación está impulsada por el movimiento de los protones a través de la membrana por el canal de la base F_0. Por consiguiente, de acuerdo con este modelo, la energía eléctrica almacenada en el gradiente de protones se traduce en energía mecánica de un tallo rotatorio, la cual se transforma luego en energía química almacenada en ATP.

Evidencia que apoya el mecanismo de cambio en la unión y catálisis rotatoria La publicación que hicieron John Walker y colaboradores del *Medical Research Council*, de Inglaterra en 1994 de un modelo atómico detallado de la cabeza F_1 proporcionó mucha evidencia estructural que apoya el mecanismo de cambio de unión de Boyer. Primero, reveló la estructura de cada uno de los sitios catalíticos en una enzima estática, con lo que confirmó que difieren en su conformación y en su afinidad por los nucleótidos. Se identificaron las estructuras correspondientes a las conformaciones L, T y O en los sitios catalíticos de las tres subunidades beta. Segundo, reveló que la subunidad gamma de la enzima mantiene una posición perfecta dentro de la sintetasa de ATP para transmitir los cambios de conformación del sector de membrana F_0 a los sitios catalíticos F_1. Pudo advertirse que la subunidad gamma se extendía como un tallo desde el sector F_0 por el tallo y hasta una cavidad central dentro de la esfera F_1 (fig. 5-26*a*), donde establece contacto diferente con cada una de las tres subunidades beta (fig. 5-26*b*).

El extremo apical de la subunidad gamma es asimétrico, y en cualquier instante determinado, diferentes caras de la subunidad gamma interactúan con las distintas subunidades beta, lo que hace que adopten conformaciones diferentes (L, T y O). Conforme rota, cada sitio de unión de la subunidad gamma interactúa de modo sucesivo con las tres subunidades beta de



(a)



(b)

FIGURA 5-26 Base estructural de la conformación del sitio catalítico. *a*) Un corte a través de la cabeza F_1 muestra la organización espacial de sus tres subunidades. La subunidad gamma se construye con dos hélices alfa extendidas entrelazadas para formar un rollo enrollado. Este tallo helicoidal se proyecta hacia la cavidad central de F_1 y entre las subunidades alfa y beta de cada lado. La conformación del sitio catalítico de la subunidad beta (a la izquierda) depende de su contacto con la subunidad gamma. *b*) Una vista superior de la cabeza F_1 muestra la disposición de las seis subunidades alfa y beta (ilustradas en rojo y amarillo) alrededor de la subunidad gamma asimétrica (mostrada en azul). La subunidad gamma está en posición para rotar en relación con las subunidades que la rodean. También es evidente que la subunidad gamma hace contacto de diferente forma con cada una de las tres subunidades beta, lo que induce a cada una de ellas a adoptar una conformación diferente. $β_E$ corresponde a la conformación O, $β_{TP}$ a la conformación L y $β_{DP}$ a la conformación T. (Reimpresa con autorización de J. P. Abrahams, et al., cortesía de John E. Walker, Nature 370:624, 627, 1994. © 1994, Macmillan Magazines Limited.)

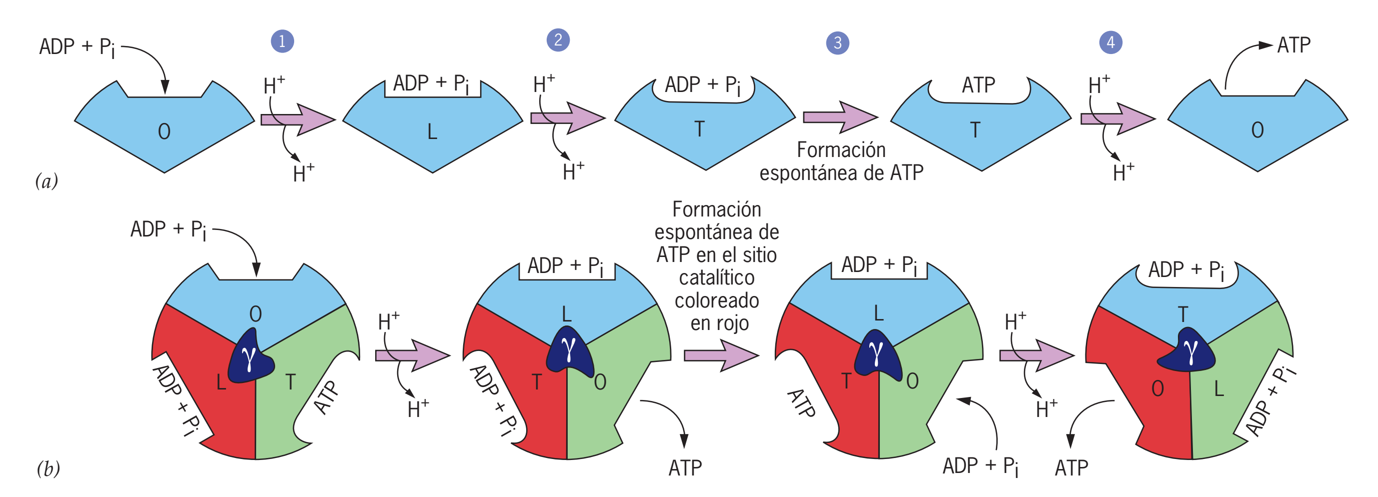


FIGURA 5-27 Mecanismo de cambio de unión para la síntesis de ATP. *a)* Representación esquemática que muestra los cambios en un solo sitio catalítico durante un ciclo de catálisis. Al principio del ciclo, el sitio está en su conformación abierta (O) y los sustratos ADP y P_i entran al sitio. En el paso 1, el movimiento de protones por la membrana induce un cambio a la conformación laxa (L) en la que los sustratos se unen con soltura. En el paso 2, el movimiento de protones adicionales induce un cambio a la conformación ajustada (T), en la que es mayor la afinidad por los sustratos, lo que hace que éstos se unan con fuerza al sitio catalítico. En el paso 3, el ADP y el P_i unidos con firmeza se condensan en forma espontánea para formar una molécula de ATP unida con intensidad; no se requiere ningún cambio de la conformación para este paso. En el paso 4, el movimiento de protones adicionales induce un cambio hacia la conformación abierta (O), en la que la afinidad por ATP disminuye de forma notable y permite la liberación del producto. Una vez que el ATP se separa, el sitio catalítico queda disponible para la unión con sustrato y se repite el ciclo. *b)* Esquema que muestra los cambios en los tres sitios catalíticos de la enzima al mismo tiempo. El movimiento de protones por la porción F_0 de la enzima causa la rotación de la subunidad gamma asimétrica, la cual presenta tres caras diferentes a las subunidades catalíticas. A medida que la subunidad gamma gira, provoca cambios en la conformación del sitio catalítico de las subunidades beta, lo que hace que el sitio catalítico pase de manera sucesiva por las conformaciones T, O y L.

F_1. Durante un solo ciclo catalítico, la subunidad gamma gira 360° completos, lo que hace que cada sitio catalítico pase en forma secuencial por las conformaciones L, T y O. Este mecanismo se ilustra en la figura 5-27 y se describe con detalle en su pie. Como se indica en la figura 5-27*a*, la condensación de ADP y P_i para formar ATP ocurre cuando cada subunidad está en la conformación T. Como se señala en la figura 5-23*b*, la subunidad épsilon se relaciona con la porción "inferior" de la subunidad gamma y las dos subunidades rotan juntas como una unidad fija.

Se ha obtenido evidencia directa de la rotación de la subunidad gamma respecto de las subunidades αβ en diversos experimentos. Si "ver es creer", entonces la demostración más convincente proviene del trabajo de Masasuke Yoshida y colaboradores en el *Instituto de Tecnología de Tokio* y la *Universidad Keio* en Japón en 1997. Estos investigadores diseñaron un sistema ingenioso para observar la enzima cuando cataliza la reacción inversa de la que ocurre en la célula en condiciones normales. Primero, prepararon una versión con modificaciones genéticas de la porción operativa de la sintetasa de ATP, consistente en tres subunidades alfa, tres subunidades beta y una subunidad gamma ($\alpha_3\beta_3\gamma$) (fig. 5-28). Este complejo polipeptídico se fijó por su cabeza a un cubreobjetos de vidrio y se conectó un pequeño filamento de actina, con marca fluorescente al extremo de la subunidad gamma que se proyectaba hacia el medio (fig. 5-28). Cuando se incubó la preparación con ATP y se observó en el microscopio, se vio que los filamentos de actina con marca fluorescente rotaban como hélices microscó-

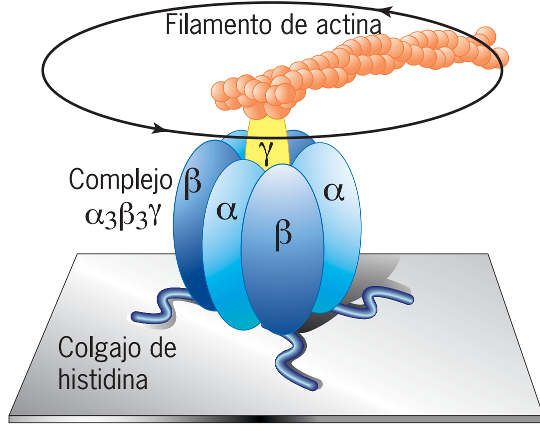


FIGURA 5-28 Observación directa de la catálisis rotatoria. Para realizar el experimento se preparó una versión modificada de una porción de la sintetasa de ATP consistente en $\alpha_3\beta_3\gamma$. Cada subunidad beta se modificó para contener 10 residuos de histidina en su extremo N, un sitio localizado en la cara externa (matriz) de la cabeza F_1. Las cadenas laterales de la histidina tienen gran afinidad por una sustancia (Ni-NTA) que se utilizó para cubrir el cubreobjetos. La subunidad gamma se modificó mediante la sustitución de uno de los residuos de serina cercanos al extremo del tallo por un residuo de cisteína, lo cual suministró un medio para unir el filamento de actina con marca fluorescente. En presencia de ATP se observó que el filamento de actina se mueve en sentido levógiro (cuando se ve desde el lado de la membrana). Cuando las concentraciones de ATP son bajas, se pudo advertir que los filamentos de actina giran en pasos de 120°. (REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE H. NOJI, ET AL., CORTESÍA DE MASASUKE YOSHIDA, NATURE 386:300, 1997. © 1997, MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)

picas impulsadas por la energía liberada cuando las moléculas de ATP se unían e hidrolizaban por los sitios catalíticos de las subunidades beta.

En fechas más recientes, un tipo similar de complejo F_1 fue "forzado" a realizar la actividad más desafiante de la que se realiza de manera normal dentro de la célula: la síntesis de ATP. En este estudio, una cuenta magnética microscópica se fijó a la subunidad γ de una molécula F_1 individual y luego se le hizo girar en el sentido de las manecillas del reloj al someter a la preparación a un campo magnético giratorio. Cuando una de estas moléculas F_1 se colocó dentro de una microcámara transparente en presencia de ADP y P_i, la rotación forzada de la subunidad γ condujo a la síntesis de ATP, que se acumuló hasta concentraciones de μM. Como se esperaría con base en el modelo, se sintetizaron tres moléculas de ATP con cada giro de 360°. Cuando se retiró el campo magnético, la subunidad γ giró de manera espontánea en el sentido inverso, impulsando la hidrólisis del ATP recién sintetizado. En conjunto, estos innovadores experimentos de bioingeniería demuestran de manera inequívoca que la sintetasa de ATP opera como un motor rotatorio.

Las máquinas rotatorias son frecuentes en las sociedades industrializadas; se utilizan turbinas rotatorias, taladros rotatorios, ruedas y hélices rotatorias, por mencionar sólo algunas. Sin embargo, los instrumentos rotatorios son muy raros en los organismos vivos. Por ejemplo, no hay organelos en las células eucariotas, articulaciones ni estructuras de alimentación rotatorios en el mundo biológico. De hecho, sólo se conocen dos tipos de estructuras biológicas que contienen partes rotatorias: las sintetasas de ATP (y proteínas afines que actúan como bombas iónicas) y los flagelos bacterianos (que se ilustran en la figura 1-14*a*, recuadro) y ambos pueden describirse como "nanomáquinas" rotatorias porque su tamaño se mide en nanómetros. Los ingenieros ya comenzaron a inventar instrumentos a escala nanométrica elaborados con materiales inorgánicos que algún día podrían realizar varios tipos de actividades mecánicas submicroscópicas. La construcción de motores de dimensiones nanométricas implica un reto particular y ya comenzaron los intentos para usar la sintetasa de ATP para impulsar dispositivos inorgánicos simples. Algún día, los seres humanos podrían emplear ATP en lugar de electricidad para impulsar algunos de sus instrumentos más delicados.

Uso del gradiente de protones para impulsar los mecanismos catalíticos: la función de la porción F_0 de la sintetasa de ATP Para 1997 ya se tenía un conocimiento detallado de los mecanismos operativos del complejo F_1, pero aún debían responderse preguntas importantes sobre la estructura y función de la porción F_0 de la enzima unida a la membrana. Las más importantes eran: ¿cuál es el camino que toman los protones cuando se mueven por el complejo F_0 y cómo es que este movimiento conduce a la síntesis de ATP? Al respecto se postuló lo siguiente:

1. Las subunidades *c* de la base F_0 se ensamblaban en un anillo que se encuentra dentro de la bicapa de lípidos (como en la figura 5-23*b*).
2. El anillo *c* está unido con la subunidad gamma del tallo.
3. El movimiento "colina abajo" de los protones por la membrana impulsa la rotación del anillo de subunidades *c*.
4. La rotación del anillo *c* de F_0 proporciona la fuerza de torsión (*torque*) que impulsa la rotación de la subunidad gamma unida, lo que conduce a la síntesis y liberación de ATP.

Todas estas suposiciones se han confirmado. A continuación se describe cada uno de estos aspectos con más detalle.

Un conjunto de evidencias, incluidas la cristalografía por rayos X y la microscopia con fuerza atómica, demostró que las subunidades *c* en realidad están organizadas en un círculo para formar un complejo anular (fig. 5-24). Las micrografías electrónicas de alta resolución indican que las dos subunidades *b* y la subunidad *a* del complejo F_0 están fuera del anillo de las subunidades *c*, como se muestra en la figura 5-23. Se cree que las subunidades *b* son sobre todo componentes estructurales de la sintetasa de ATP. Las dos subunidades *b* alargadas forman un *tallo periférico* que conecta las porciones F_0 y F_1 de la enzima (fig. 5-23*b*) y se piensa que junto con la subunidad delta de F_1 sostienen las subunidades $\alpha_3\beta_3$ en una posición fija mientras la subunidad gamma gira dentro del centro del complejo.

La rotación del anillo *c* de F_0 durante la síntesis de ATP ya se demostró de manera experimental en preparaciones de membrana, lo que confirma que tanto el anillo *c* como la subunidad gamma actúan como rotores durante la actividad enzimática. ¿Cómo se conectan estas dos "partes móviles"? Cada subunidad *c* está formada como una horquilla: contiene dos hélices transmembranosas conectadas por un asa hidrófoba que se proyecta hacia la cabeza F_1. Se piensa que las asas hidrofílicas situadas en la parte superior de las subunidades *c* forman un sitio de unión para las bases de las subunidades gamma y épsilon, que juntas actúan como un "pie" que se une con el anillo *c* (figs. 5-23*b* y 5-29). Como resultado de esta unión, la rotación del anillo *c* hace girar también a la subunidad gamma unida.

El mecanismo por el cual los movimientos de H^+ impulsan la rotación del anillo *c* es más complejo y no se ha comprendido bien. La figura 5-29 presenta un modelo de la forma en que los iones H^+ podrían fluir por el complejo F_0. Durante la explicación siguiente del modelo hay que tener en mente: a) que las subunidades del anillo *c* pasan en forma sucesiva por una subunidad *estacionaria a*, y b) que los protones se recogen del espacio intermembranoso uno a la vez por cada subunidad *c* y se transportan *por un círculo completo* antes de liberarse en la matriz. En este modelo, cada subunidad *a* tiene dos medios canales que están separados entre sí. Un medio canal conduce del espacio intermembranoso (citosólico) hacia el centro de la subunidad *a* y el otro lleva del centro de la subunidad *a* hacia la matriz. Se propuso que cada protón se mueve del espacio intermembranoso a través del medio canal y se une con un residuo de ácido aspártico de carga negativa situado en la superficie de la subunidad *c* adyacente (fig. 5-29). La unión del protón con el grupo carboxilo genera un cambio mayor en la conformación de la subunidad *c* que hace que ésta rote unos 30° en sentido levógiro. El movimiento de la subunidad *c* recién unida al protón hace que la subunidad adyacente en el anillo (que se unió con un protón en un paso previo) se alinee con el segundo medio canal de la subunidad *a*. Una vez ahí, el ácido aspártico libera su protón relacionado, el cual se difunde a la matriz. Después de la separación del protón, la subunidad *c* regresa a su conformación original y está lista para aceptar otro protón del espacio intermembranoso y repetir el ciclo.

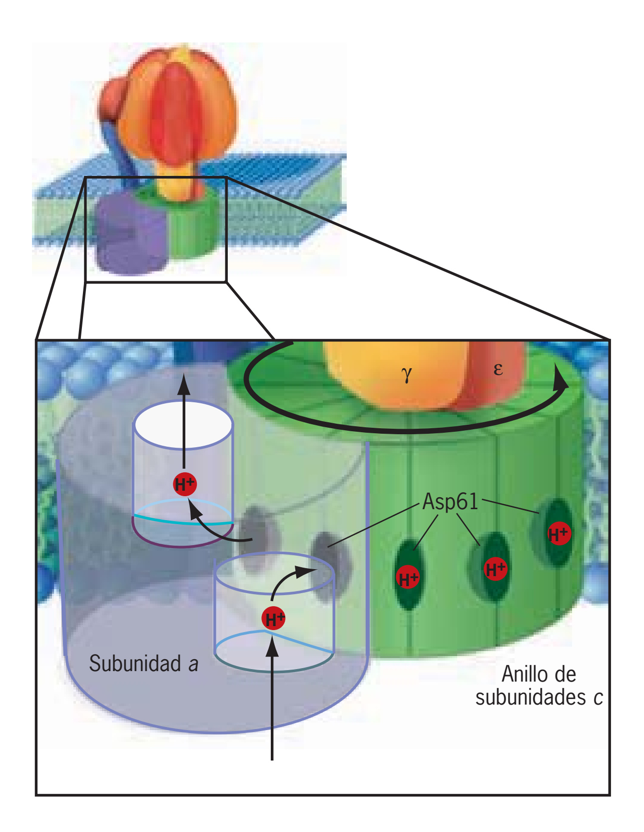


FIGURA 5-29 Modelo en el cual se une la difusión de protones con la rotación del anillo *c* del complejo F_0. Como se explica en el texto, en este modelo se propuso que cada protón del espacio intermembranoso entra a un semicanal dentro de la subunidad *a* y luego se une con un residuo de ácido aspártico (Asp61 en *E. coli*) accesible en una de las subunidades *c*. La unión con protones induce un cambio en la conformación que hace que el anillo se mueva unos 30°. El protón unido se transporta un círculo completo por la rotación del anillo *c* y luego se libera en un segundo semicanal que se abre hacia la matriz. Una sucesión de protones que impulsen esta actividad hace que el anillo *c* gire en sentido levógiro, como se muestra.

De acuerdo con este modelo, el ácido aspártico de cada subunidad *c* actúa como un portador giratorio de protones. Un protón salta al portador en un sitio seleccionado para que lo recoja y luego lo transporta en un círculo antes de liberarlo en un punto seleccionado para hacerlo. El movimiento del anillo se impulsa por los cambios en la conformación relacionados con la unión y disociación secuencial con los protones del residuo de ácido aspártico de cada subunidad *c*. En la página 200 se señaló que ya se demostró que el anillo *c* contiene entre 10 y 14 subunidades, según sea la fuente. Para simplificar la explicación, se describe un anillo *c* formado por 12 subunidades, como se ilustra en la figura 5-29. En este caso, la asociación/disociación de cuatro protones en la forma descrita movería el anillo 120°. El movimiento del anillo *c* en 120° impulsaría la rotación correspondiente de la subunidad gamma unida 120°, lo cual posibilitaría la liberación de una molécula recién formada de ATP por el complejo F_1. De acuerdo con esta estequiometría, la translocación de 12 protones produciría la rotación completa de 360° del anillo *c* y la subunidad gamma, así como la síntesis y liberación de tres moléculas de ATP. Si el anillo *c* contuviera más o menos 12 subunidades, la proporción H^+/ATP cambiaría, pero esto es fácil de adaptar al modelo básico de rotación impulsada por protones que se muestra en la figura 5-29.

Otras funciones para la fuerza motriz de protones además de la síntesis de ATP

Aunque la producción de ATP puede ser la actividad más importante de las mitocondrias, estos organelos participan en muchos otros procesos que requieren el ingreso de energía. A diferencia de la mayoría de los organelos que dependen sobre todo de la hidrólisis del ATP para impulsar sus actividades, las mitocondrias dependen de una fuente alternativa de energía: la fuerza motriz de protones. Por ejemplo, esta fuerza motriz de protones impulsa la captación de ADP y P_i en las mitocondrias a cambio del ATP e H^+, respectivamente. Esta y otras actividades que ocurren durante la respiración aeróbica se resumen en la figura 5-30. En otros ejemplos, la fuerza motriz de protones puede usarse como fuente de energía para "tirar" de los iones de calcio hacia la mitocondria, impulsar la reacción de la transhidrogenasa que conduce a la producción de NADPH, el poder reductor de la célula (pág. 114), y hacer que polipéptidos específicos ingresen a la mitocondria desde la matriz (fig. 8-47).

En el capítulo 3 se explicó de qué modo los niveles de ATP tienen un papel importante en el control de la velocidad de la glucólisis y el ciclo del ácido tricarboxílico mediante la regulación de la actividad de enzimas clave. Dentro de la mitocondria, el nivel de ADP es el factor determinante de la velocidad respiratoria. Cuando los niveles de ADP son bajos, los de ATP casi siempre son altos, por lo que no hay necesidad de oxidar más sustrato para proporcionar electrones a la cadena respiratoria. En estas condiciones, la síntesis de ATP es escasa, por lo que los protones no pueden reingresar a la matriz mitocondrial a través de la sintetasa de ATP. Esto conduce a la acumulación sostenida de fuerza motriz de protones, lo que a su vez inhibe las reacciones de bombeo de protones en la cadena de transporte de electrones y el consumo de oxígeno por la oxidasa de citocromo. Cuando la proporción ATP/ADP disminuye, el consumo de oxígeno aumenta en forma súbita. Ya se demostró que muchos factores influyen en la velocidad de la respiración mitocondrial, pero las vías que regulan la respiración no se conocen bien.

REVISIÓN ?

1. Describa la estructura básica de la sintetasa de ATP.
2. Describa los pasos en la síntesis de ATP de acuerdo con el mecanismo de cambio en la unión.
3. Describa parte de la evidencia que apoya el mecanismo de cambio de unión.
4. Describa un mecanismo propuesto en el que la difusión de protones del espacio intermembranoso a la matriz impulse la fosforilación de ADP.

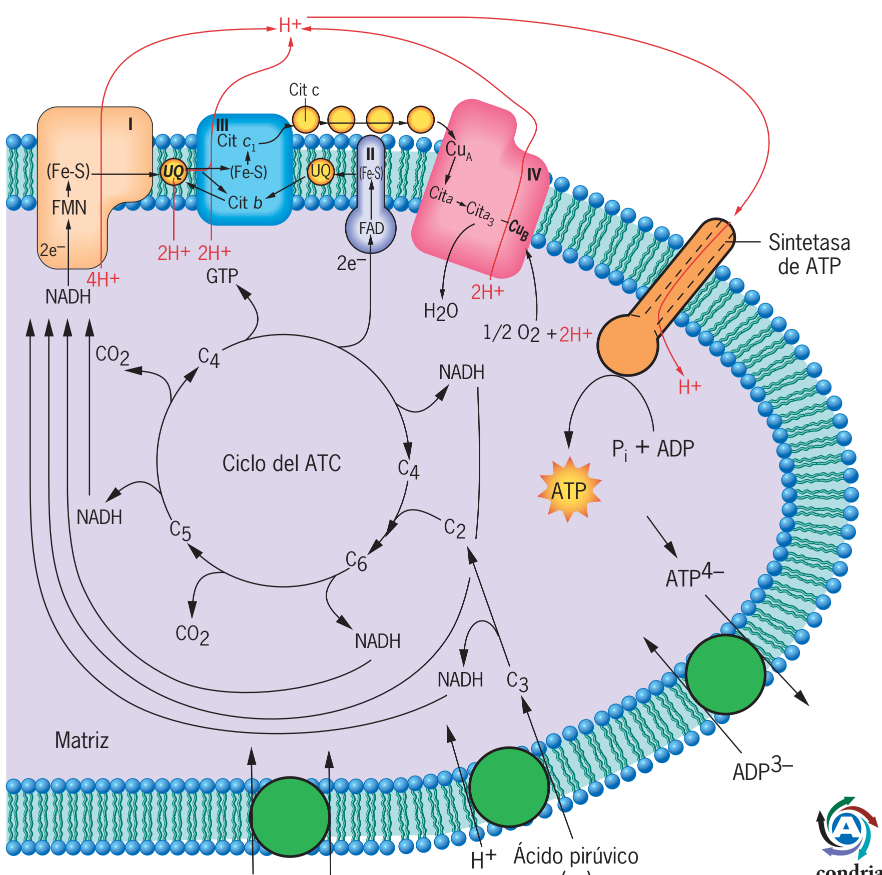
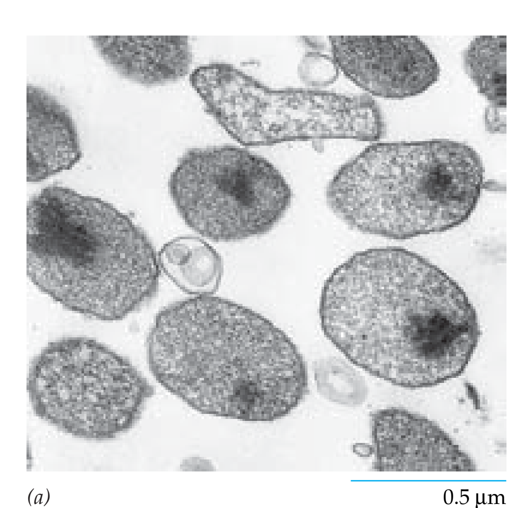


FIGURA 5-30 Resumen de las principales actividades durante la respiración aeróbica en una mitocondria.

5.6 PEROXISOMAS

Los **peroxisomas** son vesículas simples limitadas por membranas (fig. 5-31*a*) con un diámetro de 0.1 a 1.0 μm que pueden contener un centro denso y cristalino de enzimas oxidativas. Los peroxisomas (o *microcuerpos*, como se les llama también) son organelos con múltiples funciones y contienen más de 50 enzimas que participan en actividades tan diversas como la oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA, aquellos con cadenas que tienen 24 a 26 carbonos) y la síntesis de plasmalógenos, que es una clase inusual de fosfolípidos en los que uno de los ácidos grasos está unido con el glicerol mediante un enlace éter en lugar de uno éster. Los plasmalógenos son



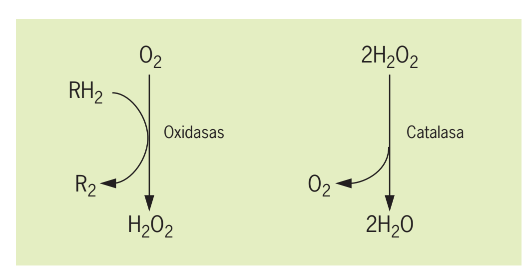


FIGURA 5-31 Estructura y función de los peroxisomas. *a*) Micrografía electrónica de los peroxisomas purificados aislados por centrifugación a través de un gradiente de densidad de sacarosa. En la figura 6-23 se muestra la micrografía electrónica de un peroxisoma dentro de una célula vegetal. *b*) Los peroxisomas contienen enzimas que realizan la reducción en dos pasos del oxígeno molecular hasta agua. En el primer paso, una oxidasa retira electrones de diversos sustratos (RH_2), como el ácido úrico o aminoácidos. En el segundo paso, la enzima catalasa convierte en agua el peróxido de hidrógeno formado en el primer paso. (*A*, TOMADA DE Y. FUJIKI, ET AL., J CELL BIOL 93:105, 1982. CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DE ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

muy abundantes en las vainas de mielina que aíslan los axones del cerebro (fig. 4-5). Las anomalías en la síntesis de plasmalógenos pueden dar origen a disfunción neurológica grave. La enzima luciferasa, que genera la luz que emiten las luciérnagas, también es una enzima peroxisómica. Los peroxisomas se consideran en este capítulo porque comparten varias propiedades con las mitocondrias: ambos organelos se forman por la separación de organelos preexistentes; ambos tipos de organelos importan proteínas ya formadas del citosol (sección 8.9) y los dos participan en tipos similares de metabolismo oxidativo. De hecho, por lo menos una enzima, la aminotransferasa de alanina/glioxilato, se encuentra en las mitocondrias de algunos mamíferos (p. ej., gatos y perros) y en los peroxisomas de otros (p. ej., conejos y seres humanos).

Estos organelos se llamaron "peroxisomas" porque son el sitio de donde se sintetiza y degrada el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un agente oxidante muy reactivo y tóxico. El peróxido de hidrógeno se produce por acción de varias enzimas peroxisómicas, incluida la oxidasa de urato, oxidasa de glucolato y oxidasas de aminoácidos, que utilizan oxígeno molecular para oxidar sus sustratos respectivos (fig. 5-31*b*). El H_2O_2 generado en estas reacciones se degrada pronto mediante la enzima catalasa, que está presente en grandes concentraciones en estos organelos. La importancia de los peroxisomas en el metabolismo humano resulta evidente en la sección Perspectiva humana de este capítulo.

Los peroxisomas también existen en las plantas. Las plantas de semillero contienen un tipo especializado de peroxisoma, llamado **glioxisoma** (fig. 5-32). Las plantas de semillero dependen de los ácidos grasos almacenados para obtener energía y materiales a fin de formar una nueva planta. Una de las principales actividades metabólicas de estas plantas jóvenes es la conversión de los ácidos grasos almacenados en carbohidrato. La degradación de los ácidos grasos almacenados genera acetil-CoA, la cual se condensa con oxaloacetato para formar citrato, que luego se convierte en glucosa por efecto de una serie de enzimas del ciclo del glioxilato localizadas en el glioxisoma. La función de los peroxisomas en el metabolismo de las células de la hoja se describe en la sección 6.6.

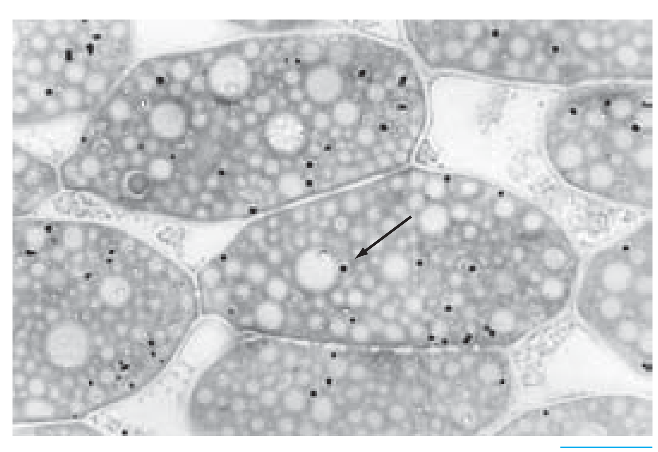


FIGURA 5-32 Localización del glioxisoma dentro de las plantas de semillero. Micrografía óptica de un corte a través de los cotiledones de semillas de algodón empapadas. Los glioxisomas, que se ven como pequeñas estructuras oscuras (flecha), se hicieron visibles mediante tinción citoquímica para la enzima catalasa. (Tomada de Kent D. Chapman y Richard N. Trelease. J Cell Biol 115:998, 1991. Con autorización de los derechos reservados de Rockefeller University Press.)

REVISIÓN

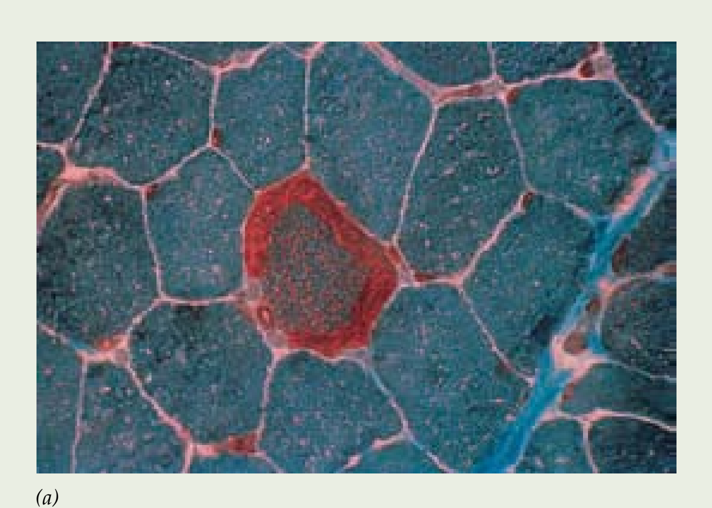
1. ¿Cuáles son algunas de las principales actividades de los peroxisomas?, ¿cuál es la función de la catalasa en estas actividades?
2. ¿Qué similitudes tienen los peroxisomas con las mitocondrias?, ¿de qué manera son únicos?

PERSPECTIVA HUMANA

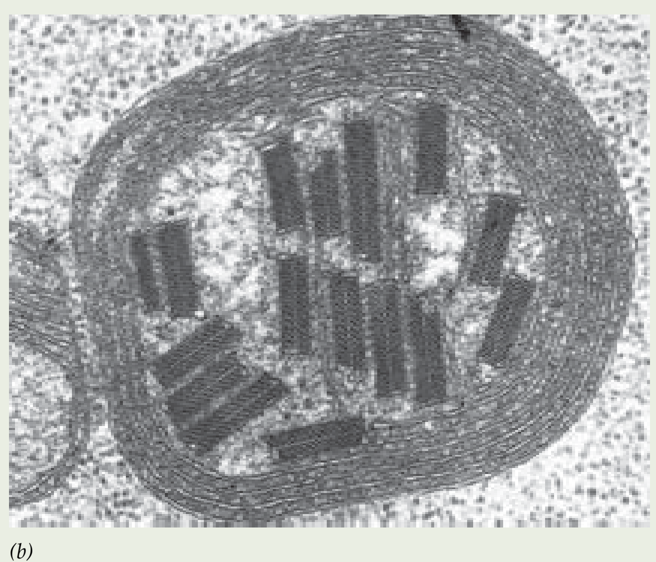
Enfermedades consecutivas a la función anormal de mitocondrias o peroxisomas

Mitocondrias

En 1962, Rolf Luft de la *Universidad de Estocolmo* en Suecia publicó un estudio sobre mitocondrias aisladas de una mujer que había sufrido fatiga y debilidad muscular por un periodo prolongado y que además tenía una tasa metabólica y temperatura corporal elevadas. Las mitocondrias de esta paciente mostraban cierta libertad del control respiratorio normal. En condiciones normales, cuando los niveles de ADP son bajos, las mitocondrias aisladas suspenden la oxidación de sustrato. En contraste, las mitocondrias de esta paciente continuaban la oxidación del sustrato a gran velocidad, incluso en ausencia de ADP para fosforilar, lo que producía calor en lugar de un trabajo mecánico. Desde ese informe inicial se han descrito diversos trastornos cuyo origen se rastrea hasta anormalidades en la estructura y función mitocondriales. Según sean las circunstancias descritas más adelante, la gravedad de estos padecimientos varía desde enfermedades que causan la muerte durante la lactancia, trastornos que producen convulsiones, ceguera, sordera o episodios parecidos a apoplejía, hasta alteraciones leves caracterizadas por intolerancia al ejercicio o espermatozoides inmóviles. Los



(a)



(b)

FIGURA 1 Anormalidades mitocondriales en músculo esquelético. *a*) Fibras rojas desgarradas. Estas fibras musculares degeneradas provienen de una biopsia de un paciente y muestran acumulaciones de "manchas" rojas justo debajo de la membrana plasmática de la célula, que se deben a la proliferación anormal de las mitocondrias. *b*) Micrografía electrónica que muestra inclusiones cristalinas dentro de la matriz mitocondrial de las células de un sujeto con mitocondrias anormales. (*A*, CORTESÍA DE DONALD R. JOHNS; *B*, TOMADA DE JOHN A. MORGAN-HUGHES Y D. N. LANDON, EN MYOLOGY, 2ND ED. A. G. ENGEL Y C. FRANZINI-ARMSTRONG (EDS.), MCGRAW-HILL, 1994.)

pacientes con alteraciones graves casi siempre tienen fibras musculares esqueléticas anormales que contienen grandes agregados periféricos de mitocondrias (fig. 1*a*). El examen más detenido de las mitocondrias revela grandes cantidades de inclusiones anormales (fig. 1*b*).

Más de 95% de los polipéptidos de la cadena respiratoria son codificados por genes que residen en el núcleo. Y sin embargo, la mayoría de las mutaciones vinculadas con enfermedades mitocondriales se ha rastreado hasta mutaciones en el DNA mitocondrial, o mtDNA. Los trastornos más graves casi siempre se originan de mutaciones (o deleciones) que afectan genes que codifican RNA de transferencia mitocondrial, el cual es necesario para la síntesis de los 13 polipéptidos producidos en las mitocondrias humanas. Como todos los genes que están en el mtDNA codifican proteínas necesarias para la fosforilación oxidativa, se esperaría que todos los tipos de mutaciones en el mtDNA ocasionaran un fenotipo clínico similar. Está claro que no es así.

La herencia de los trastornos mitocondriales contrasta en varias formas con la herencia mendeliana de los genes nucleares. Las mitocondrias presentes en las células de un embrión humano provienen exclusivamente de las mitocondrias que estaban en el óvulo al momento de la concepción, sin contribución alguna del espermatozoide que lo fecundó. Por consiguiente, los trastornos mitocondriales se heredan por línea materna. Además, es posible que las mitocondrias de una célula contengan una mezcla de mtDNA normal (tipo nativo) y mutante, un trastorno conocido como *heteroplasmía.* El nivel de mtDNA mutante varía de un órgano a otro en la misma persona y los síntomas suelen aparecer sólo cuando en un tejido particular predominan las mitocondrias con la información genética defectuosa. A causa de esta variabilidad, los miembros de una familia portadora de la misma mutación en el DNA mitocondrial pueden tener síntomas muy diferentes.

Otra diferencia entre el DNA nuclear y mitocondrial es que el primero está protegido contra daño por varios sistemas de reparación de DNA (sección 13.2). El DNA mitocondrial también puede estar sujeto a niveles altos de radicales de oxígeno mutágenos (pág. 34). Por estas razones, el DNA mitocondrial tiene un índice de mutaciones 10 veces mayor que el DNA nuclear. Existe una probabilidad particular de que haya mutaciones mitocondriales en las células que permanecen en el cuerpo por más tiempo, como las de los tejidos nervioso y muscular. Varias afecciones neurológicas comunes de inicio en el adulto, en particular la enfermedad de Parkinson, podrían ser consecuencia de cambios degenerativos de la función mitocondrial. Al principio, esta posibilidad surgió a la luz por primera vez a principios del decenio de 1980, cuando varios drogadictos llegaron a los hospitales con inicio súbito de temblores musculares intensos característicos de la enfermedad de Parkinson avanzada en ancianos. Se descubrió que estos sujetos se habían inyectado una heroína sintética por vía intravenosa que estaba contaminada con un compuesto llamado MPTP. Estudios posteriores revelaron que el MPTP causa daño en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que condujo a la muerte de las células nerviosas en la misma región del cerebro (la sustancia negra) que se afecta en pacientes con enfermedad de Parkinson. Cuando se estudiaron luego las células de la sustancia negra de las personas con esta enfermedad también se encontró que mostraban una disminución marcada y selectiva de la actividad del complejo I. En fechas más recientes, las investigaciones han referido la exposición a ciertos pesticidas, en especial rotenona, un inhibidor conocido del complejo I, como factores de riesgo ambientales para el desarrollo de enfermedad de Parkinson. La administración de rotenona a ratas causa destrucción de las neuronas productoras de dopamina, algo característico de la enfermedad en seres humanos. El posible vínculo entre la rotenona y la enfermedad de Parkinson está en estudio.

Desde hace mucho se ha especulado que la acumulación gradual de mutaciones en el mtDNA es un factor causal importante en el envejecimiento humano. Esta hipótesis es alimentada por el hecho de que las células tomadas de personas mayores tienen mayor cantidad de mutaciones en el mtDNA comparadas con las mismas células de individuos más jóvenes. Pero, ¿son estas mutaciones una causa de envejecimiento o simplemente una consecuencia de un proceso de envejecimiento subyacente más básico que afecta muchas propiedades fisiológicas? La evidencia más fuerte en apoyo de las mutaciones del mtDNA como causa subyacente del envejecimiento proviene de estu-

dios con ratones modificados por ingeniería genética de tal modo que su mtDNA acumula tres a ocho veces más mutaciones que sus hermanos normales de la misma camada. Estos ratones "mutadores" parecen normales durante los primeros seis a nueve meses de edad, pero entonces desarrollan rápidamente signos de envejecimiento prematuro, como decremento auditivo, encanecimiento y osteoporosis (fig. 2). Mientras que los ratones testigo tienen un lapso de vida de más de 850 días, los miembros del grupo experimental sólo viven unos 450 días. Resulta interesante que los animales modificados genéticamente no presenten indicios de mayor daño oxidativo (por radicales libres), así que no es claro cómo es que el aumento en la tasa de mutación del mtDNA causa este fenotipo. También es importante considerar las limitaciones de este tipo de estudio. Las mutaciones en el mtDNA pueden ser suficientes para hacer que un animal envejezca prematuramente, pero no son parte obligada del proceso de envejecimiento *normal*. Además, queda por ver si este tipo de envejecimiento acelerado ocurre por la misma vía que el normal.

FIGURA 2 Fenotipo de envejecimiento prematuro causado por aumento de la frecuencia de mutaciones en el mtDNA. La fotografía muestra un ratón normal de 13 meses de edad y su hermano de la misma camada "viejo", cuyo DNA mitocondrial alberga un número anormalmente alto de mutaciones. Este fenotipo de envejecimiento prematuro fue causado por una mutación en el gen nuclear que codifica la polimerasa de DNA responsable de la duplicación del mtDNA. (Cortesía de Jeff Miller, University of Wisconsin-Madison, proporcionada por G. C. Kujoth.)

Peroxisomas

El síndrome de Zellweger es una rara anomalía hereditaria reconocible por diversas alteraciones neurológicas, visuales y hepáticas que causan la muerte en la lactancia temprana. En 1973, Sidney Goldfischer y colaboradores del *Albert Einstein College of Medicine* informaron que las células hepáticas y renales de estos pacientes carecían de peroxisomas. Las investigaciones posteriores revelaron que los peroxisomas no estaban del todo ausentes de las células de estas personas, sino que se encontraban en la forma de "fantasmas" membranosos vacíos, esto es, que estos organelos carecían de las enzimas normales de los peroxisomas. No es que estos sujetos sean incapaces de sintetizar las enzimas peroxisómicas, sino que las enzimas no se importan a los peroxisomas y permanecen en el citosol, donde son incapaces de realizar sus funciones normales. Los estudios genéticos de las células de pacientes con síndrome de Zellweger mostraron que el trastorno puede precipitarse por mutaciones en 12 genes distintos, por lo menos, todos los cuales codifican proteínas que participan en la captación de enzimas peroxisómicas del citosol.

A diferencia del síndrome de Zellweger, que afecta a una gran variedad de funciones peroxisómicas, varios de los trastornos hereditarios se caracterizan por la ausencia de una sola enzima peroxisómica. Una de estas anormalidades por deficiencia de una sola enzima es la suprarrenoleucodistrofia (ALD), que fue tema de la película *Lorenzo's Oil*, de 1993. Los niños con esta enfermedad casi nunca presentan alteraciones hasta la parte intermedia de la infancia, cuando aparecen los síntomas de insuficiencia suprarrenal y disfunción neurológica. La enfermedad se debe a un defecto de una proteína de membrana que transporta ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA) hacia los peroxisomas, donde se metabolizan. En ausencia de esta proteína, los VLCFA se acumulan en el cerebro y destruyen las vainas de mielina que aíslan las células nerviosas. En la película *Lorenzo's Oil,* los padres de un niño afectado por esta enfermedad descubren que una dieta rica en ciertos ácidos grasos puede retrasar el avance de la enfermedad. Los estudios ulteriores han tenido resultados contradictorios sobre el valor de esta dieta.

Varios pacientes con ALD han tenido buenos resultados con el trasplante medular, lo cual proporciona células normales capaces de metabolizar los VLCFA, y con la administración de fármacos (p. ej., lovastatina) que pueden reducir los niveles de VLCFA. También se planean estudios clínicos con terapia génica.

SINOPSIS

Las mitocondrias son organelos grandes formados por una membrana externa porosa y una membrana interna muy impermeable, formada sobre todo por pliegues (crestas) que contienen gran parte de los mecanismos necesarios para la respiración aeróbica. La porosidad de la membrana externa se debe a las proteínas integrales llamadas porinas. La configuración de la membrana interna y la fluidez aparente de su bicapa facilitan las interacciones de los componentes necesarios durante el transporte de electrones y la formación de ATP. La membrana interna rodea una matriz gelatinosa que además de proteínas contiene un sistema genético que incluye DNA, RNA, ribosomas y todos los mecanismos necesarios para transcribir y traducir la información genética. Muchas de las propiedades de las mitocondrias pueden explicarse con su supuesta evolución a partir de bacterias simbióticas antiguas (pág. 180).

La mitocondria es el centro del metabolismo oxidativo en la célula y convierte los productos del catabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas en energía química almacenada en ATP. El piruvato y el NADH son los dos productos de la glucólisis. El piruvato se transporta a través de la membrana mitocondrial interna, donde se descarboxila y combina con la coenzima A para formar acetil-CoA, la cual se condensa con oxaloacetato para formar citrato, que alimenta al ciclo del ácido tricarboxílico. A su paso por las reacciones del ciclo del ATC, se retiran dos de los carbonos del citrato y se liberan como CO_2, que representa el estado más oxidado del átomo de carbono. Los electrones retirados de los sustratos se transfieren al FAD y NAD^+ para formar $FADH_2$ y NADH. Los ácidos grasos se degradan para formar acetil-CoA, la cual alimenta al ciclo del ATC, y los 20 aminoácidos se degradan en piruvato, acetil-CoA o productos intermedios del ciclo del ATC. Por lo tanto, el ciclo del ATC es la vía en la que convergen las principales vías catabólicas de la célula (pág. 183).

Los electrones transferidos de los sustratos al $FADH_2$ y NADH pasan por una cadena de portadores de electrones hasta el O_2, lo que

libera energía que se emplea para generar un gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna. El movimiento controlado de los protones de regreso por la membrana mediante una enzima productora de ATP se emplea para impulsar la formación de ATP en el sitio catalítico de la enzima. Cada par de electrones de NADH libera energía suficiente para impulsar la formación de unas tres moléculas de ATP, mientras que la energía liberada de un par de electrones de $FADH_2$ permite la formación de dos moléculas de ATP (pág. 187).

La cantidad de energía liberada como un electrón se transfiere de un donante (agente reductor) a un receptor (agente oxidante) y puede calcularse a partir de la diferencia en el potencial redox entre las dos parejas. El potencial redox estándar de una pareja se mide en condiciones estándar y se compara con la pareja H_2-H^+. El potencial redox estándar de la pareja NADH-NAD^+ es –0.32 V, reflejo del hecho de que NADH es un agente reductor fuerte, es decir, que transfiere con facilidad sus electrones. El potencial redox estándar de la pareja H_2O–O_2 es +0.82 V, lo que indica que el O_2 es un agente oxidante potente, con gran afinidad por los electrones. La diferencia entre estas dos parejas, que equivale a 1.14 V, proporciona una medida de la energía libre liberada (52.6 kcal/mol) cuando se pasa un par de electrones de NADH a lo largo de la cadena transportadora de electrones hasta el O_2 (pág. 189).

La cadena transportadora de electrones contiene cinco tipos diferentes de portadores: citocromos que contienen hemo, flavoproteínas que poseen el nucleótido flavina, proteínas con hierro-azufre, átomos de cobre y quinonas. Las flavoproteínas y las quinonas son capaces de aceptar y donar átomos de hidrógeno, en tanto que los citocromos, átomos de cobre y proteínas hierro-azufre pueden aceptar y donar sólo electrones. Los portadores de la cadena de transporte de electrones están dispuestos en orden creciente de potencial redox positivo. Los diversos portadores se organizan en cuatro complejos multiproteicos grandes. El citocromo *c* y la ubiquinona son portadores móviles y emiten electrones entre los grandes complejos. Cuando los pares de electrones pasan por los complejos I, III y IV, se traslada una cantidad específica de protones de la matriz a través de la membrana y hacia el espacio intermembranoso. El traslado de protones mediante estos complejos transportadores de electrones establece el gradiente de protones en el que se almacena la energía. El último de los complejos es la oxidasa de citocromo, que transfiere electrones del citocromo *c* a O_2, y lo reduce para formar agua, paso que también retira protones de la matriz y contribuye al gradiente de protones (pág. 191).

La translocación de protones crea una separación de carga a través de la membrana, además de una diferencia en la concentración de protones. Por consiguiente, el gradiente de protones tiene dos componentes, un gradiente de voltaje y otro de pH, cuyas magnitudes dependen del movimiento de otros iones a través de la membrana. Juntos, los dos componentes constituyen una fuerza motriz de protones (Δp). En las mitocondrias de los mamíferos, casi 80% de la energía libre de Δp se representa por el voltaje y 20% radica en el gradiente del pH (pág. 198).

La enzima que cataliza la formación de ATP es un complejo multiproteico grande llamado sintetasa de ATP. La sintetasa de ATP contiene dos partes distintas: una cabeza F_1 que sobresale hacia la matriz e incluye sitios catalíticos, y una base F_0 que está incrustada en la bicapa de lípidos y forma un canal por el cual se conducen protones del espacio intermembranoso hacia la matriz. En la hipótesis de cambio de unión para la formación de ATP, que ya tiene una aceptación general, el movimiento controlado de los protones por la porción F_0 de la enzima induce la rotación de la subunidad gamma de la enzima, la cual transcurre por el tallo y conecta las porciones F_0 y F_1 de la enzima. La rotación de la subunidad gamma se logra con la rotación del anillo *c* de la base F_0, inducida por el movimiento de protones a través de semicanales en la subunidad *a*. La rotación de la subunidad gamma induce cambios en la conformación de los sitios catalíticos F_1, lo que impulsa la formación de ATP. La evidencia indica que el paso que requiere energía no es la fosforilación real del ADP, sino la liberación del ATP producido del sitio activo, que ocurre como respuesta a los cambios inducidos en la conformación. Además de la formación de ATP, la fuerza motriz de protones también suministra la energía necesaria para varias actividades de transporte, incluida la captación de ADP en la mitocondria a cambio de la liberación de ATP al citosol, la captación de fosfato e iones calcio y la importación de proteínas mitocondriales (pág. 199).

Los peroxisomas son vesículas citoplásmicas unidas a la membrana que realizan diversas reacciones metabólicas, incluida la oxidación de urato, glucolato y aminoácidos, con lo que se genera H_2O_2 (pág. 207).

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. Considérese la reacción A:H + B $\rightleftharpoons$ B:H + A. Si, en equilibrio, la proporción de [B:H]/[B] es igual a 2.0, se puede concluir que: a) B:H es el agente reductor más potente de los cuatro compuestos; b) la pareja (A:H-A) tiene un potencial redox más negativo que la pareja (B:H-B); c) ninguno de los cuatro compuestos es citocromo; d) los electrones relacionados con B tienen mayor energía que los relacionados con A. ¿Cuáles de las aseveraciones previas son verdaderas? Trace una de las semirreacciones para esta oxidorreducción.
2. La vesícula membranosa de una partícula submitocondrial después de retirar las esferas F_1 sería capaz de: a) oxidar NADH; b) producir H_2O a partir de O_2; c) generar un gradiente de protones; d) fosforilar ADP. ¿Cuáles de las afirmaciones anteriores son verdaderas?, ¿qué diferencias habría en la respuesta si los objetos estudiados fueran partículas submitocondriales intactas tratadas con dinitrofenol?
3. La proteína A es una flavoproteína con un potencial redox de –0.2 V. La proteína B es un citocromo con un potencial redox de +0.1 V.
   a. Trace las semirreacciones para cada uno de estos dos portadores de electrones.
   b. Presente la reacción que ocurriría si se mezclaran moléculas A reducidas y moléculas B oxidadas.
   c. ¿Qué dos compuestos de la reacción de la parte b estarían presentes en mayor concentración cuando la reacción alcanzara el equilibrio?
4. ¿Cuál de las siguientes sustancias es el agente reductor más fuerte: ubiquinona, citocromo *c*, NAD^+, NADH, O_2 o H_2O?, ¿cuál es el agente oxidante más fuerte?, ¿cuál tiene la mayor afinidad por los electrones?
5. Si se determinara que la membrana mitocondrial interna es permeable a los iones cloro, ¿qué efecto tendría esto en la fuerza motriz de protones a través de la membrana mitocondrial interna?
6. Observe la caída de la energía durante el transporte de electrones que se muestra en la figura 5-14. ¿En qué sería diferente este perfil si el donante de electrones original fuera $FADH_2$ en lugar de NADH?

7. ¿Esperaría que la importación de P_i diera lugar a un descenso de la fuerza motriz de protones?, ¿por qué?
8. En la carta de potenciales redox estándar del cuadro 5-1, la pareja oxaloacetato-malato es menos negativa que la pareja NAD^+-NADH. ¿En qué forma son consistentes estos valores con la transferencia de electrones de malato a NAD^+ en el ciclo del ácido tricarboxílico?
9. ¿Cuántos trifosfatos de alta energía se forman con la fosforilación al nivel del sustrato durante cada giro del ciclo del ATC (considérense sólo las reacciones del ciclo del ATC)?, ¿cuántos se forman como resultado de la fosforilación oxidativa?, ¿cuántas moléculas de CO_2 se liberan?, ¿cuántas moléculas de FAD se reducen?, ¿cuántos pares de electrones se separan del sustrato?
10. El ensamblaje de grupos Fe-S, que ocurre en la matriz mitocondrial, es muy vulnerable a la presencia de O_2. Dada la importancia de las mitocondrias en el metabolismo aerobio, ¿parece ser éste un lugar improbable para que ocurra dicho proceso?
11. La caída de la $\Delta G^{\circ\prime}$ de un par de electrones es −52.6 kcal/mol y la $\Delta G^{\circ\prime}$ de la formación de ATP es +7.3 kcal/mol. Si se forman tres moléculas de ATP por cada par de electrones separados del sustrato, ¿puede concluirse que la fosforilación oxidativa tiene sólo una eficiencia de 21.9/52.6 o 42%?, ¿por qué?
12. ¿Esperaría que las mitocondrias con actividad metabólica acidificaran o alcalinizaran el medio en el que están suspendidas?, ¿sería distinta su respuesta si trabajaran con partículas submitocondriales y no con mitocondrias?, ¿por qué?
13. Asúmase que el movimiento de tres protones es necesario para la síntesis de una molécula de ATP. Calcule la energía que se libera con el paso de tres protones a la matriz (véase la página 198 para obtener más información).
14. ¿Esperaría que las mitocondrias aisladas pudieran realizar la oxidación de la glucosa con la producción acompañante de ATP?, ¿por qué?, ¿cuál sería un compuesto adecuado para agregar a la preparación de mitocondrias aisladas a fin de lograr la síntesis de ATP?
15. Calcule la energía libre que se libera cuando $FADH_2$ se oxida por O_2 molecular en condiciones estándar.
16. Con base en el conocimiento sobre la organización de la mitocondria y la manera en que genera ATP, responda las preguntas siguientes. Dé una breve explicación de cada respuesta.
    a. ¿Cuál sería el efecto de la producción de ATP si se agregara una sustancia (protonóforo) que provocara que la membrana mitocondrial posibilitara el escape de protones?
    b. ¿Cuál sería el efecto de la reducción del suministro de oxígeno en el pH de la matriz mitocondrial?
    c. Presupóngase que el suministro celular de glucosa se reduce en proporción considerable. ¿Cuál sería el efecto sobre la producción de CO_2 en la mitocondria?
17. Asúmase que puede manipular el potencial de la membrana interna de una mitocondria aislada. Se mide el pH de la matriz mitocondrial y se observa que es de 8.0. El pH de la solución que la baña es de 7.0. Se coloca una pinza en la membrana interna con un potencial de +59 mV, esto es, que obliga a la matriz a tener un valor positivo de 59 mV con respecto al medio. En estas circunstancias, ¿puede la mitocondria usar el gradiente de protones para impulsar la síntesis de ATP? Explique su respuesta.
18. Supóngase que puede sintetizar una sintetasa de ATP que carezca de la subunidad gamma. ¿Cómo se compararían los sitios catalíticos de las subunidades beta de esta enzima entre sí?, ¿por qué?
19. Desde el punto de vista funcional, la sintetasa de ATP puede dividirse en dos partes: un "estabilizador" formado por subunidades que no se mueven durante la catálisis y un "rotor" formado por las partes móviles. ¿Qué subunidades de la enzima constituyen cada una de estas dos partes?, ¿cómo se relacionan las estructuras de las partes inmóviles del estabilizador de F_0 con las partes inmóviles del estabilizador de F_1?
20. Las células contienen una proteína llamada F_1 que se une con fuerza al sitio catalítico de la sintetasa de ATP, lo que inhibe su actividad en ciertas circunstancias. ¿Puede pensar en alguna circunstancia en la que tal inhibidor pudiera ser útil para la célula?
21. El DNA mitocondrial es duplicado por la enzima polimerasa γ de DNA. Los ratones "mutadores" que se consideraron en la página 210 tenían este fenotipo porque poseían una polimerasa γ que tendía a cometer errores al copiar su plantilla de mtDNA. Se señalaron un par de limitaciones al interpretar estos estudios en términos del proceso de envejecimiento normal. ¿Qué piensa usted que podría aprenderse al generar ratones que tuvieran una polimerasa γ superexacta, es decir, una que cometiera menos errores que la versión normal (silvestre)?

SITIO EN INTERNET www.wiley.com/college/karp

Las animaciones y los videos indicados en este capítulo pueden visitarse en el sitio de Cell and Molecular Biology de Karp en Internet. También hallará todas las respuestas a las preguntas analíticas recién planteadas, autoexámenes que le ayudarán a prepararse para los exámenes, y vínculos con fascinantes recursos. La sección lecturas adicionales que sigue se amplía en el sitio en Internet.

LECTURAS ADICIONALES

Andersen, J. L. et al. 2000. Muscles, genes, and athletic performance. *Sci. Am.* 283:48–55. (Sept.)

Berry, R. M. 2005. ATP synthesis: the world's smallest wind-up toy. *Curr. Biol.* 15:R385–R387.

Bölter, B. & Soll, J. 2001. Ion channels in the outer membranes of chloroplasts and mitochondria: open doors or regulated gates? *EMBO J.* 20:935–940.

Brzezinski, P. 2004. Redox-driven membrane-bound proton pumps. *Trends Biochem. Sci.* 29:380–387.

Cannon, B. & Nedergaard, J. 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Revs.* 84:277–359.

Cecchini, G. 2003. Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu. Rev. Biochem.* 72:77–109.

Chan, D. C. 2006. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125:1241–1252.

Chinnery, P. F. 2002. Modulating heteroplasmy. *Trends Gen.* 18:173–176.

Dimroth, P., et al. 2003. Electrical power fuels rotary ATP synthase. *Structure* 11:1469–1473.

Falkowski, P. G. 2006. Tracing oxygen's imprint on Earth's metabolic evolution. *Science* 311:1724-1725.

Harris, D. A. 1995. *Bioenergetics at a Glance.* Blackwell.

Hederstedt, L. 2003. Complex II is complex too. *Science* 299:671–672.

Jenner, P. 2001. Parkinson's disease, pesticides, and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci.* 24:245–247.

Junge, W. & Nelson, N. 2005. Nature's rotary electromotors. *Science* 308:642–644.

Karplus, M. & Gao, Y. Q. 2004. Biomolecular motors: The F_1-ATP-ase paradigm. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14:250–259.

Kerr, R. A. 2005. The story of O_2. *Science* 308:1730–1732.

Krauss, S., et al. 2005. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 6:248–261.

Lane, N. 2006. Powerhouse of disease. *Nature* 440:600–602. [sobre enfermedad mitocondrial.]

Miller, R. A., et al. 2005. Evaluating evidence for [mitochondrial DNA mutations and] aging. *Science* 310:441–443.

Pakendorf, B. & Stoneking, M. 2005. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu. Rev. Genomics Hum. Gen.* 6:165–183.

Senior, A. E. & Weber, J. 2004. Happy motoring with ATP synthase. *Nature Struct. Mol. Biol.* 11:110–112.

Taylor, R. W. & Turnbull, D. M. 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Revs. Gen.* 6:389–402.

Tedeschi, H. 2005. Old and new data, new issues: the mitochondrial $\Delta\psi$. *Biochim. Biophys. Acta* 1709:195–202.

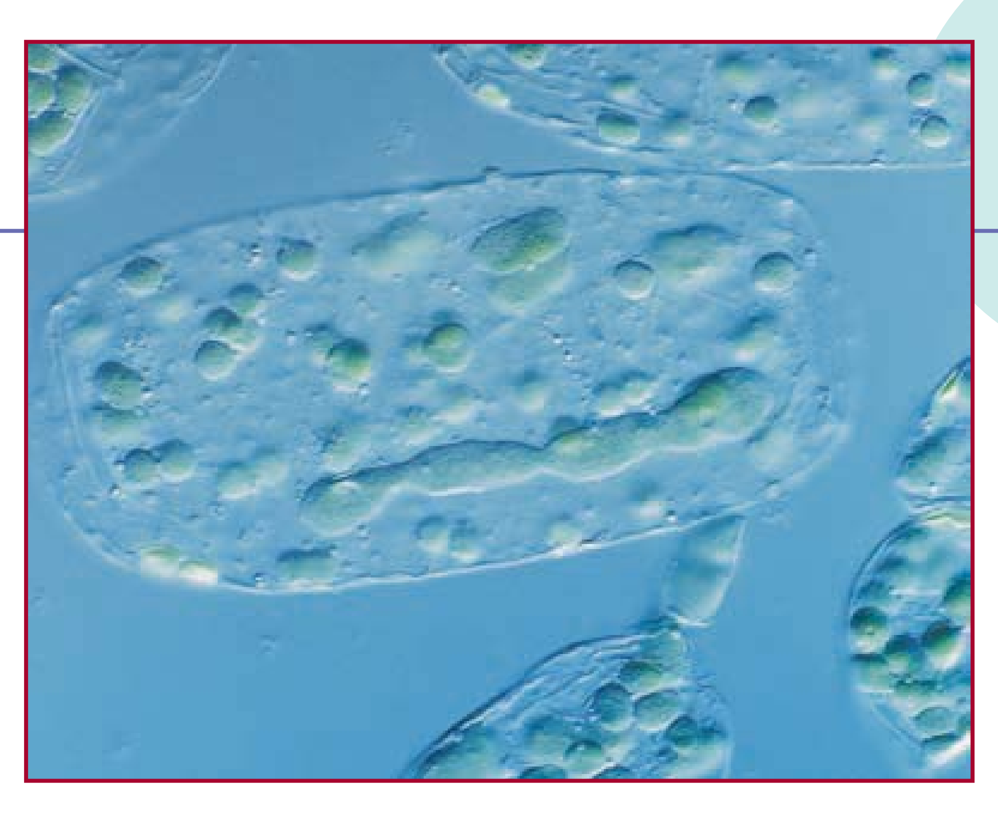
Weller, S., et al. 2003. Peroxisome biogenesis disorders. *Annu. Rev. Genomics Hum. Res*. 4:1645–210.

Westermann, B. & Neupert, W. 2003. "Omics" of the mitochondrion. *Nature Biotech.* 21:239–240. [proteómica de organelos.]

Wikström, M. 2004. Cytochrome *c* oxidase: 25 years of the elusive proton pump. *Biochim. Biophy. Acta* 1655:241–247.

Zeviani, M. & Di Donato, S. 2004. Mitochondrial disorders. *Brain* 127:2153–2172.

CAPÍTULO 6



La fotosíntesis y el cloroplasto

Las primeras formas de vida sobre la Tierra debieron haber obtenido sus materias primas y energía de moléculas orgánicas simples disueltas en su ambiente acuoso. Estas moléculas orgánicas tuvieron que formarse por medios abióticos, o sea como resultado de reacciones químicas no biológicas que ocurrieron en los océanos primitivos. Por tanto, justo como los seres humanos sobreviven con los nutrimentos que toman de su ambiente, del mismo modo debieron ser las formas de vida originales. Los organismos que dependían de una fuente externa de compuestos orgánicos se llamaron **heterótrofos**.

El número de organismos heterótrofos que vivió en la Tierra primitiva debió ser muy limitado porque la producción espontánea de moléculas orgánicas es muy lenta. La evolución de la vida en el planeta recibió un impulso tremendo con la aparición de organismos que empleaban una nueva estrategia metabólica. A diferencia de sus predecesores, estos organismos podían fabricar sus propios nutrimentos orgánicos a partir de tipos más sencillos de moléculas inorgánicas, como el dióxido de carbono (CO_2) y el sulfuro de hidrógeno (H_2S). Los organismos capaces de sobrevivir con CO_2 como su principal fuente de carbono se denominan **autótrofos**.

Micrografía óptica de una célula epidérmica viva de una hoja de Arabidopsis thaliana. *La célula contiene varios cloroplastos, los organelos que alojan la maquinaria fotosintética de la planta. En condiciones normales los cloroplastos se dividen por fisión binaria en la que un solo estrechamiento divide el organelo en dos hijas iguales. Esta célula proviene de una planta mutante que se caracteriza por fisión asimétrica. El cloroplasto muy alargado inició la fisión asimétrica en varios sitios, como lo indican los múltiples estrechamientos. Las mutantes son invaluables para la identificación de genes participantes en todo tipo de procesos celulares. Por lo general un gen sólo se vuelve visible cuando funciona mal y brinda a los investigadores una idea de la función normal del gen, en este caso su participación en la fisión del cloroplasto.* (Cortesía de Kevin D. Stokes y Stanislav Vitha, Michigan State University.)

La manufactura de moléculas orgánicas complejas a partir de CO_2 demanda grandes cantidades de energía. En el curso de la evolución surgieron dos tipos principales de autótrofos que se distinguen por su fuente de energía. Los **quimioautótrofos** utilizan la energía almacenada en moléculas inorgánicas (como amoniaco, sulfuro de hidrógeno o nitritos) para convertir el CO_2 en compuestos orgánicos, mientras que los **fotoautótrofos** emplean la energía radiante del sol para obtener el mismo resultado. Como todos los quimioautótrofos son procariotas y su contribución relativa a la formación de la biomasa en la Tierra es pequeña, sus actividades metabólicas no se consideran más. Por otro lado, los fotoautótrofos son los encargados de capturar la energía que impulsa las actividades de la mayor parte de los organismos de la Tierra. El grupo de fotoautótrofos incluye plantas y algas eucariotas, varios protistas flagelados y miembros de varios grupos de procariotas. Todos estos organismos realizan **fotosíntesis**, un proceso en el que la energía de la luz solar se transforma en energía química que se almacena en carbohidratos y otras moléculas orgánicas.

Durante la fotosíntesis se retiran electrones con relativamente baja energía de un compuesto donador y se convierten en electrones de alta energía con la energía absorbida de la luz.[1] Estos electrones de alta energía se emplean después en la síntesis de moléculas biológicas reducidas, como almidón y aceites. Es probable que los primeros grupos de fotoautótrofos, que pudieron haber dominado la Tierra durante dos mil millones de años, utilizaran sulfuro de hidrógeno como su fuente de electrones para la fotosíntesis, con la reacción general

$$CO_2 + 2\,H_2S \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + H_2O + 2\,S$$

donde (CH_2O) representa una unidad de carbohidrato. Muchas bacterias actuales efectúan este tipo de fotosíntesis; la figura 6-1 muestra un ejemplo. Sin embargo, como en la actualidad el sulfuro de hidrógeno no es abundante ni se encuentra en cualquier parte, los organismos que dependen de este compuesto como fuente de electrones se limitan a hábitat como los manantiales de azufre y respiraderos en la profundidad del océano.

Hace cerca de 2 700 millones de años apareció en la Tierra un nuevo tipo de procariota fotosintético que podía utilizar una fuente mucho más abundante de electrones, el agua. El uso del agua no sólo permitió a estos organismos (las cianobacterias) explotar una variedad mucho más amplia de hábitat en el planeta (véase fig. 1-15), también produjo un compuesto de desecho con consecuencias enormes para todas las formas de vida. El producto de desecho era oxígeno molecular (O_2), que se forma por la reacción general

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + O_2$$

El cambio de H_2S a H_2O como sustrato para la fotosíntesis es más difícil que la sustitución de una letra por otra. El potencial redox de la pareja S-H_2S es −0.25 V en comparación con +0.816 V de la pareja O_2-H_2O (pág. 190). En otras palabras, el átomo de azufre en una molécula de H_2S tiene mucha menor afinidad por sus electrones (y por tanto se oxida con más facilidad) que el átomo de oxígeno en la molécula de agua. En consecuencia, si un organismo va a realizar la fotosíntesis *oxigénica* (liberadora de oxígeno) tiene que generar un agente oxidante muy fuerte como parte de su metabolismo fotosintético para tirar de los electrones bien sujetos del agua. El cambio de H_2S (u otros sustratos reducidos) en H_2O como fuente de electrones para la fotosíntesis requirió una revisión de la maquinaria fotosintética.

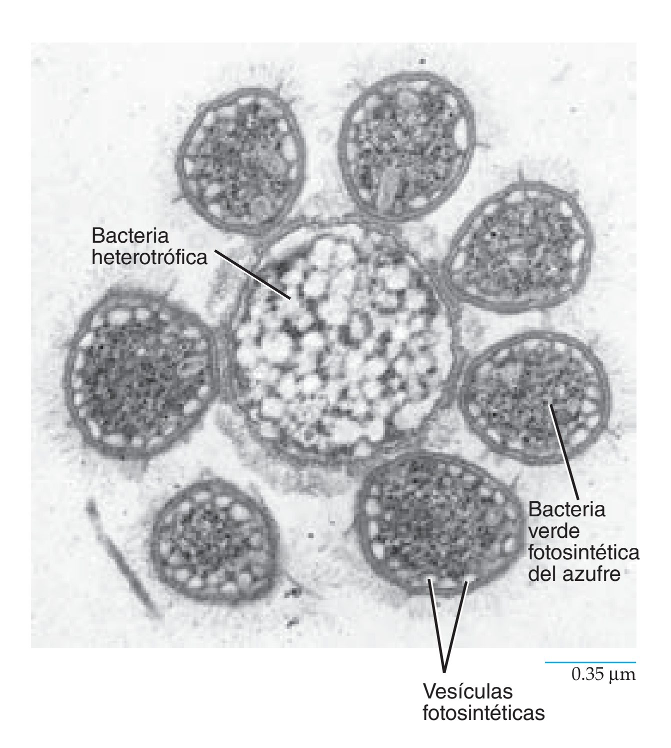


FIGURA 6-1 **Bacterias fotosintéticas verdes de azufre** se encuentran como un anillo de células periféricas que mantienen una relación simbiótica con una sola bacteria anaerobia heterotrófica en el centro de la "colonia". La bacteria heterotrófica recibe materiales orgánicos producidos por los simbiontes fotosintéticos. Las vesículas fotosintéticas que contienen la maquinaria para capturar la luz son visibles en las bacterias verdes del azufre. (Reimpresa con autorización de Tom Fenchel, Science 296:1070, 2002, cortesía de Kenneth J. Clarke. Derechos reservados 2002, American Association for the Advancement of Science.)

En algún momento de la evolución una de estas cianobacterias ancestrales productoras de oxígeno se alojó dentro de una célula proeucariota no fotosintética que contenía mitocondrias. Con el tiempo las cianobacterias simbióticas se transformaron de organismos separados que vivían dentro de una célula hospedadora en un organelo citoplásmico, el **cloroplasto**. Conforme el cloroplasto evolucionó, la mayor parte de los genes que al principio estaban presentes en la cianobacteria simbiótica se perdió o se trasladó al núcleo de la célula vegetal. Como resultado los polipéptidos que se encuentran en los cloroplastos de las plantas actuales se codifican en los genomas del núcleo y del cloroplasto. Los extensos análisis de los genomas del cloroplasto sugieren que todos los cloroplastos modernos surgieron de una relación simbiótica ancestral única. Como resultado de

[1] Véase la nota al pie de la página 183 respecto al uso del término "electrones de alta energía".

su ancestro común, los cloroplastos y las cianobacterias comparten muchas características básicas, inclusive una maquinaria fotosintética similar, que se describe con detalle en las páginas siguientes.

6.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL CLOROPLASTO

Los cloroplastos se localizan sobre todo en las células mesófilas de las hojas. La estructura de una hoja y la disposición de los cloroplastos alrededor de la vacuola central de una célula mesófila se muestran en la figura 6-2. Por lo general los cloroplastos de las plantas superiores tienen forma de lente (fig. 6-3), miden cerca de 2 a 4 μm de ancho y 5 a 10 μm de largo, y casi siempre hay 20 a 40 en cada célula. Sus dimensiones determinan que los cloroplastos sean gigantes entre los organelos, tan grandes como un eritrocito de mamífero. Como se ilustra en la fotografía que abre este capítulo, los cloroplastos surgen por fisión de cloroplastos preexistentes (o sus precursores no pigmentados, que se denominan **proplástides**).

Los cloroplastos se identificaron como el sitio de la fotosíntesis en 1881 mediante un ingenioso experimento del biólogo alemán T. Engelmann. Él iluminó la células del alga verde *Spirogyra* sp. y encontró bacterias con movimientos activos reunidas fuera de la célula, cerca del sitio del gran cloroplasto con forma de listón (véase fig. 1-5). Las bacterias usaban las cantidades diminutas de oxígeno liberadas durante la fotosíntesis en el cloroplasto para su respiración aeróbica.

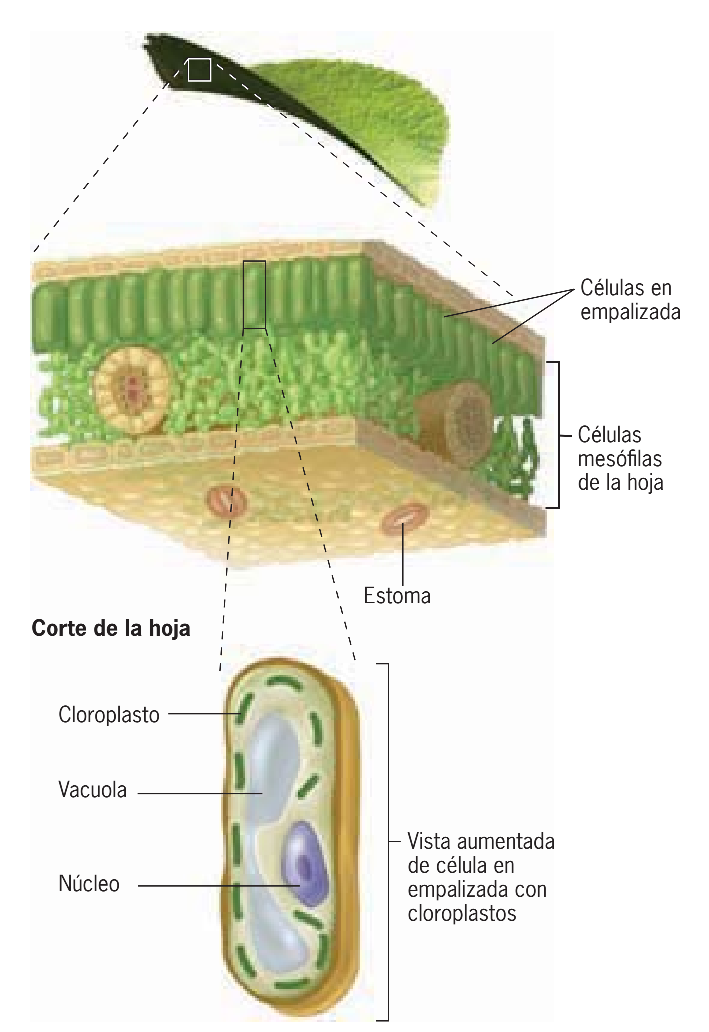
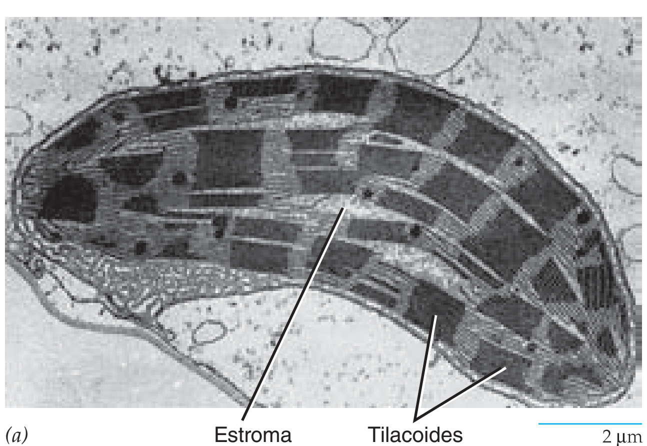


FIGURA 6-2 Organización funcional de una hoja. El corte de la hoja muestra varias capas de células que contienen cloroplastos distribuidos en el citoplasma. Estos cloroplastos realizan la fotosíntesis y proporcionan así materias primas y energía química a toda la planta.



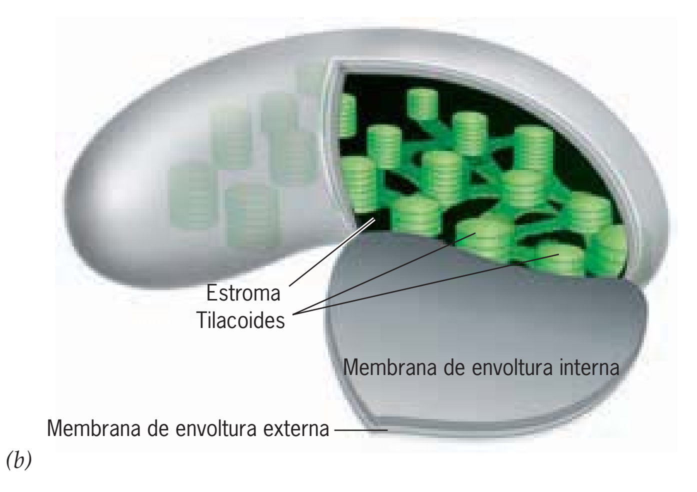


FIGURA 6-3 Estructura interna de un cloroplasto. *a*) Micrografía electrónica de transición de un solo cloroplasto. La membrana interna se dispone en pilas de tilacoides con forma de disco que están separados de la doble membrana externa que forma la envoltura. *b*) Esquema de un cloroplasto que muestra la doble membrana externa y las membranas tilacoides. (*A*, Cortesía de Lester K. Shumway.)

La cubierta externa de un cloroplasto consiste en una envoltura formada por dos membranas separadas por un espacio estrecho (fig. 6-3). Como la membrana externa de una mitocondria, la membrana externa de la envoltura del cloroplasto contiene varias porinas distintas (pág. 182). Aunque estas proteínas poseen canales hasta cierto punto grandes (alrededor de 1 nm), muestran cierta selectividad hacia diversos solutos y por tanto es probable que tengan una permeabilidad libre para los metabolitos clave, como a menudo se describe. La membrana interna de la envoltura es muy impermeable; las sustancias que la cruzan lo hacen sólo con la ayuda de diversos transportadores.

Gran parte de la maquinaria fotosintética del cloroplasto, (aun los pigmentos que absorben la luz, una cadena compleja de portadores de electrones y un aparato para sintetizar ATP), forma parte de un sistema interno de membrana separado de la envoltura de doble capa. La membrana interna del cloroplasto, que contiene la maquinaria para trasladar la energía, se organiza en sacos membranosos aplanados llamados **tilacoides**. Los tilacoides están dispuestos en pilas ordenadas que se denominan **granos** (figs. 6-3 y 6-4). El espacio interior del tilacoide es la *luz* y el espacio fuera de éste y dentro de la envoltura del cloroplasto es el **estroma**, que contiene las enzimas encargadas de la síntesis de carbohidratos.

Como la matriz de una mitocondria, el estroma de un cloroplasto alberga pequeñas moléculas de DNA circular de doble cadena y ribosomas similares a los procariotas. Como ya se explicó, el DNA del cloroplasto es una reliquia del genoma de un simbionte interno bacteriano ancestral. Según el organismo, el DNA del cloroplasto contiene entre 60 y 200 genes que participan en la expresión génica (p. ej., tRNA, rRNA, proteínas ribosómicas) o en la fotosíntesis. Casi todos los 2 000 a 3 500 polipéptidos estimados de un cloroplasto se codifican en el DNA del núcleo y se sintetizan en el citosol. Una maquinaria de transporte especializada incorpora estas proteínas hacia el cloroplasto (sección 8.9).

Las membranas tilacoides poseen un alto contenido proteico y son inusuales porque tienen cantidades más o menos pequeñas de fosfolípido. En su lugar, estas membranas albergan un alto porcentaje de glucolípidos que contienen galactosa como el que se muestra en seguida.

$CH_3-CH_2-CH{=}CH-CH_2-CH{=}CH-CH_2-CH{=}CH-(CH_2)_7-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-OCH_2$

$CH_3-CH_2-CH{=}CH-CH_2-CH{=}CH-CH_2-CH{=}CH-(CH_2)_7-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-OCH$

$CH_2OH \quad O-CH_2$

HO O OH OH

Monogalactosil diacilglicerol

Los dos ácidos grasos de estos lípidos contienen varios enlaces dobles, lo que hace que la bicapa lipídica de las membranas tilacoides sea muy fluida. La fluidez de la bicapa lipídica facilita la difusión lateral de complejos proteicos a través de la membrana durante la fotosíntesis.

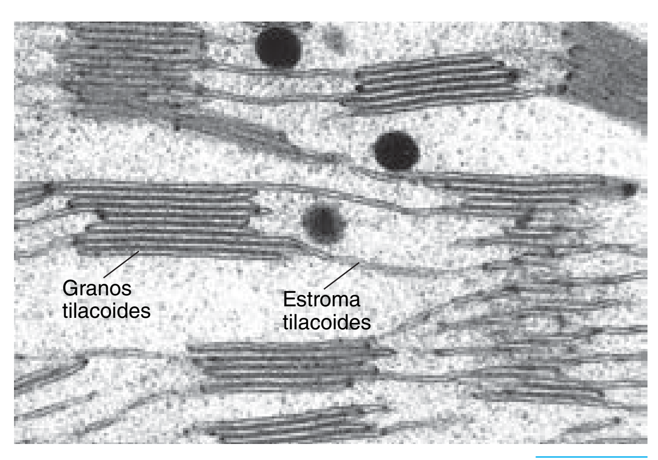


FIGURA 6-4 Membranas tilacoides. Micrografía electrónica de un corte a través de una porción de un cloroplasto de espinaca que muestra los granos tilacoides apilados, conectados entre sí por estroma tilacoide no apilado (o láminas estromales). Las esferas oscuras son gránulos de lípidos teñidos con osmio. (Tomada de L. A. Staehelin. En L. A. Staehelin (ed.), Encyclopedia of Plant Physiology, vol. 19, p. 23, Springer-Verlag, 1986.)

REVISIÓN ?

1. Describa el efecto que se cree que la evolución de las cianobacterias ejerció en el metabolismo de los organismos.
2. Describa la organización de las membranas de un cloroplasto. ¿En qué difiere esta organización de la de las mitocondrias?
3. Distinga entre estroma y luz, membrana de envoltura y membrana tilacoide, autótrofos y heterótrofos.

6.2 UNA REVISIÓN DEL METABOLISMO FOTOSINTÉTICO

Un avance importante en la comprensión de las reacciones químicas de la fotosíntesis se produjo a principio del decenio de 1930 con la proposición de C. B. van Niel, un estudiante graduado de la *Stanford University*. Considérese la ecuación general de la fotosíntesis como se presentó antes:

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + O_2$$

La creencia prevaleciente en 1930 sostenía que la energía lumínica se usaba para dividir el CO_2, con lo que se liberaba oxígeno molecular (O_2) y el átomo de carbono se transfería a una molécula de agua para formar una unidad de carbohidrato (CH_2O). En

1931, van Niel propuso un mecanismo alternativo basado en su trabajo con bacterias del azufre. Estaba demostrado que estos organismos eran capaces de reducir CO_2 en carbohidratos con la energía de la luz sin producir al mismo tiempo O_2 molecular. La reacción propuesta para las bacterias del azufre era:

$$CO_2 + 2\,H_2S \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + H_2O + 2\,S$$

Con base en la postulación de una similitud básica en los procesos fotosintéticos de todos los organismos, van Niel propuso una reacción general para incluir estas actividades:

$$CO_2 + 2\,H_2A \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O) + H_2O + 2\,A$$

Para producir de una hexosa, como la glucosa, la reacción sería

$$6\,CO_2 + 12\,H_2A \xrightarrow{\text{luz}} C_6H_{12}O_6 + 6\,H_2O + 12\,A$$

van Niel reconoció que en esencia la fotosíntesis era un proceso de oxidación-reducción. En la reacción previa, H_2A es un donante de electrones (agente reductor) y puede representar al H_2O, H_2S y a otros sustratos reducidos que utilizan los diversos tipos de bacterias. Sin embargo, el dióxido de carbono es un agente oxidante, que en una célula vegetal se reduce para formar una hexosa en la reacción siguiente:

$$6\,CO_2 + 12\,H_2O \xrightarrow{\text{luz}} C_6H_{12}O_6 + 6\,H_2O + 6\,O_2$$

En este esquema cada molécula de oxígeno no se deriva del CO_2, sino de la descomposición de dos moléculas de H_2O, un proceso impulsado por la absorción de la luz. Samuel Ruben y Martin Kamen de la *University of California, en Berkeley*, establecieron con claridad la función del agua en la formación del oxígeno molecular en 1941. Estos investigadores realizaron experimentos en suspensiones de algas verdes con un isótopo marcado de oxígeno, ^{18}O, en sustitución del isótopo usual, ^{16}O. Una muestra de algas se expuso a $C[^{18}O_2]$ marcado y agua no marcada, mientras que otra muestra se expuso a dióxido de carbono no marcado y $H_2[^{18}O]$ marcada. Los investigadores formularon una pregunta sencilla: ¿cuál de las dos muestras de organismos fotosintéticos liberaría $^{18}O_2$? Las algas que recibieron agua marcada produjeron oxígeno marcado, lo que demostró que el O_2 que se produjo durante la fotosíntesis provino de H_2O. Las algas que recibieron dióxido de carbono marcado produjeron oxígeno sin marcar, lo que confirma que el O_2 no se produce a partir de la separación química del CO_2. Contrario a la creencia popular, no era el dióxido de carbono el que se dividía en sus dos componentes atómicos, sino el agua. La hipótesis de van Niel se confirmó.

La proposición de van Niel puso la fotosíntesis en una perspectiva diferente; en esencia se convirtió en el inverso de la respiración mitocondrial. En tanto la respiración mitocondrial reduce el oxígeno en agua, la fotosíntesis en los cloroplastos oxida el agua en oxígeno. Puesto que el primer proceso libera energía, el último debe necesitarla. La figura 6-5 presenta una revisión de la termodinámica de la fotosíntesis y la respiración aeróbica. En las páginas siguientes se evidenciarán muchas similitudes entre estas dos actividades metabólicas.

Los fenómenos de la fotosíntesis pueden dividirse en dos series de reacciones. Durante la primera etapa, las **reacciones dependientes de la luz**, la energía de la luz solar se absorbe y

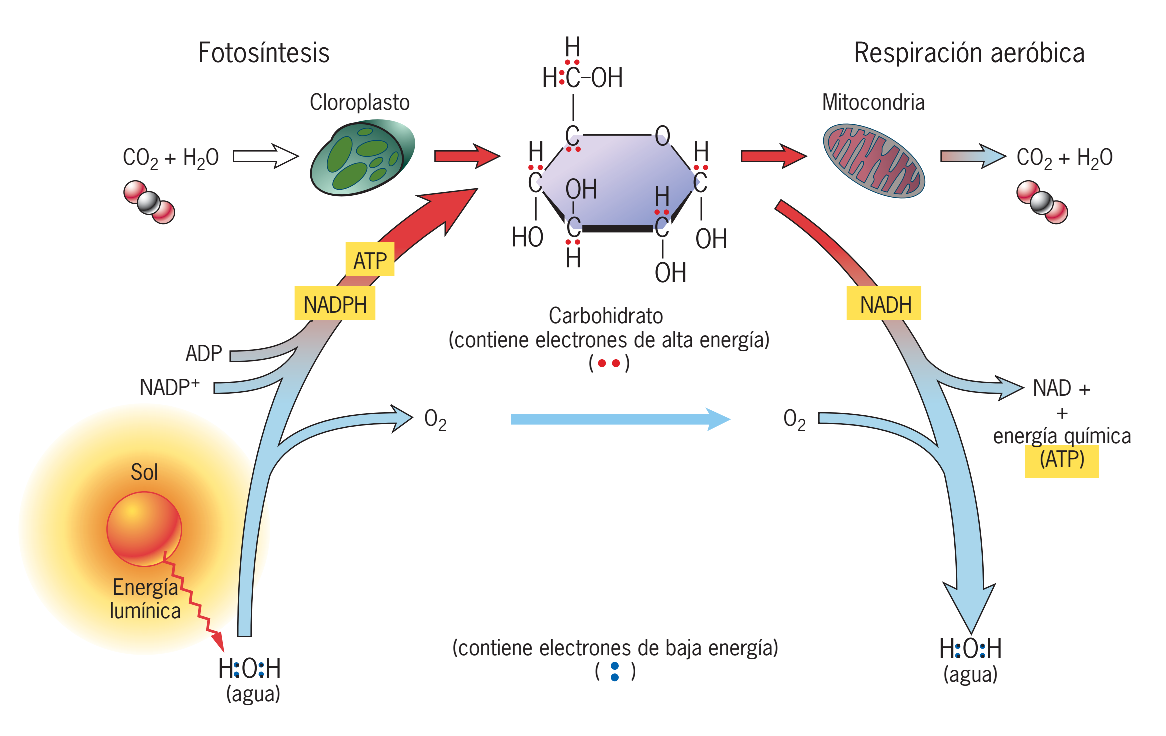


FIGURA 6-5 Una revisión de la energética de la fotosíntesis y la respiración aeróbica.

se almacena como energía química en dos moléculas biológicas clave: ATP y NADPH. Como se explicó en el capítulo 3, el ATP es la principal fuente celular de energía química y el NADPH su principal fuente de poder reductor. Durante la segunda etapa, las **reacciones independientes de la luz** (o "reacciones oscuras", como suelen llamarse), los carbohidratos se sintetizan a partir del dióxido de carbono con la energía almacenada en las moléculas de ATP y NADPH que se producen en las reacciones dependientes de la luz. Se estima que la vida vegetal en la Tierra convierte alrededor de 500 mil billones de kilogramos de CO_2 en carbohidratos cada año, una cantidad casi 10 000 veces mayor que la producción bovina anual del mundo.

A continuación se describen las reacciones dependientes de la luz, que son complejas y aún no se comprenden del todo.

REVISIÓN

1. ¿De qué manera es la fotosíntesis el inverso de la respiración?
2. ¿Qué similitud tiene la fotosíntesis no oxigénica que emplea H_2S como fuente de electrones con la fotosíntesis oxigénica que utiliza H_2O como fuente de electrones?
3. En términos generales, ¿en qué difieren las reacciones independientes de la luz de las que dependen de la luz? ¿Cuáles son los principales productos de ambos tipos de reacciones?

6.3 LA ABSORCIÓN DE LUZ

La luz viaja en paquetes (o cuantos) de energía llamados **fotones**, que pueden considerarse "partículas" de luz.[2] El contenido de energía de un fotón depende de la longitud de onda de la luz de acuerdo con la ecuación

$$E = hc/\lambda$$

donde h es la constante de Planck (1.58×10^{-34} cal · seg), c es la velocidad de la luz en el vacío y λ es la longitud de onda de la luz. Mientras más corta sea la longitud de onda, mayor es el contenido de energía. Un mol (6.02×10^{23}) de fotones con longitud de onda de 680 nm, una longitud de onda importante en la fotosíntesis, contiene alrededor de 42 kcal de energía, que equivalen al cambio en el potencial redox de casi 1.8 V (calculado al dividir 42 kcal entre la constante de Faraday de 23.06 kcal/V).

La absorción de la luz es el primer paso en cualquier proceso químico. Cuando una molécula absorbe un fotón, un electrón se vuelve lo bastante energético para trasladarse de un orbital interno a uno externo. Se dice que la molécula cambió del **estado de tierra** al **estado excitado**. Como el número de orbitales en los que un electrón puede existir es limitado y cada orbital tiene un nivel específico de energía, se deduce que cualquier átomo o molécula puede absorber sólo ciertas longitudes de onda específicas.

El estado excitado de una molécula es inestable y cabe esperar que dure sólo 10^{-9} seg. Un electrón excitado puede sufrir varias consecuencias según las circunstancias. Considérese una molécula de **clorofila**, que es el pigmento fotosintético absorbente de luz más importante. Si el electrón de una molécula de clorofila excitada regresa al orbital inferior, la energía que había absorbido debe liberarse. Si la energía se libera en forma de calor o luz (fluorescencia o fosforescencia), la clorofila regresó al estado de tierra original y la energía del fotón no se utilizó. Esto es justo lo que se observa cuando una preparación de *clorofila aislada* en solución se ilumina: la solución se vuelve fluorescente porque la energía absorbida se emite de nuevo con una longitud de onda mayor (o sea, menor energía). Sin embargo, si el mismo experimento se realiza en una preparación de *cloroplastos aislados*, sólo se observa una fluorescencia débil, lo que indica que muy poca de la energía absorbida se disipa. En lugar de eso los electrones excitados de las moléculas de clorofila se transfieren a los receptores de electrones dentro de las membranas del cloroplasto antes de tener la oportunidad de regresar a orbitales de menor energía. Por tanto, los cloroplastos son capaces de aprovechar la energía absorbida antes que se disipe.

Pigmentos fotosintéticos

Los **pigmentos** son compuestos que parecen estar coloreados porque sólo absorben luz de una longitud de onda particular dentro del espectro visible. Las hojas son verdes porque sus cloroplastos contienen grandes cantidades del pigmento clorofila, que absorbe con mayor intensidad el azul y el rojo, en tanto refleja las longitudes de onda verdes intermedias hacia los ojos del que las ve. La estructura de la clorofila se muestra en la figura 6-6. Cada molécula consiste en dos partes: un anillo de porfirina que funciona en la absorción de luz y una cadena de fitol hidrófobo que mantiene la clorofila incrustada en la membrana fotosintética. A diferencia de las porfirinas rojas que contienen hierro (grupos hemo) de la hemoglobina y la mioglobina, la porfirina de la molécula de clorofila contiene un átomo de magnesio. Los enlaces sencillos y dobles alternados a lo largo del borde del anillo de porfirina retiran electrones, con lo que se forma una nube alrededor del anillo (fig. 6-6). Se dice que los sistemas de este tipo son *conjugados* y absorben intensamente la luz visible. La energía absorbida causa una redistribución de la densidad electrónica de la molécula, lo que a su vez favorece la pérdida de un electrón que se dona a un aceptor apropiado. El sistema de enlaces conjugados también amplía los picos de absorción y ello permite que las moléculas individuales absorban la energía de un rango de longitudes de onda. Estas características son evidentes en un espectro de absorción de moléculas de clorofila purificadas (fig. 6-7). Un **espectro de absorción** es una gráfica de la intensidad de la luz absorbida en relación con su longitud de onda. El rango de longitudes de onda absorbidas por los pigmentos fotosintéticos que se hallan dentro de los tilacoides, y

[2] La idea de que la radiación electromagnética (p. ej., luz) tiene propiedades tanto de onda como de partícula surgió a principios del siglo xx a partir del trabajo de Max Planck y Albert Einstein, y marcó el comienzo del estudio de la mecánica cuántica.

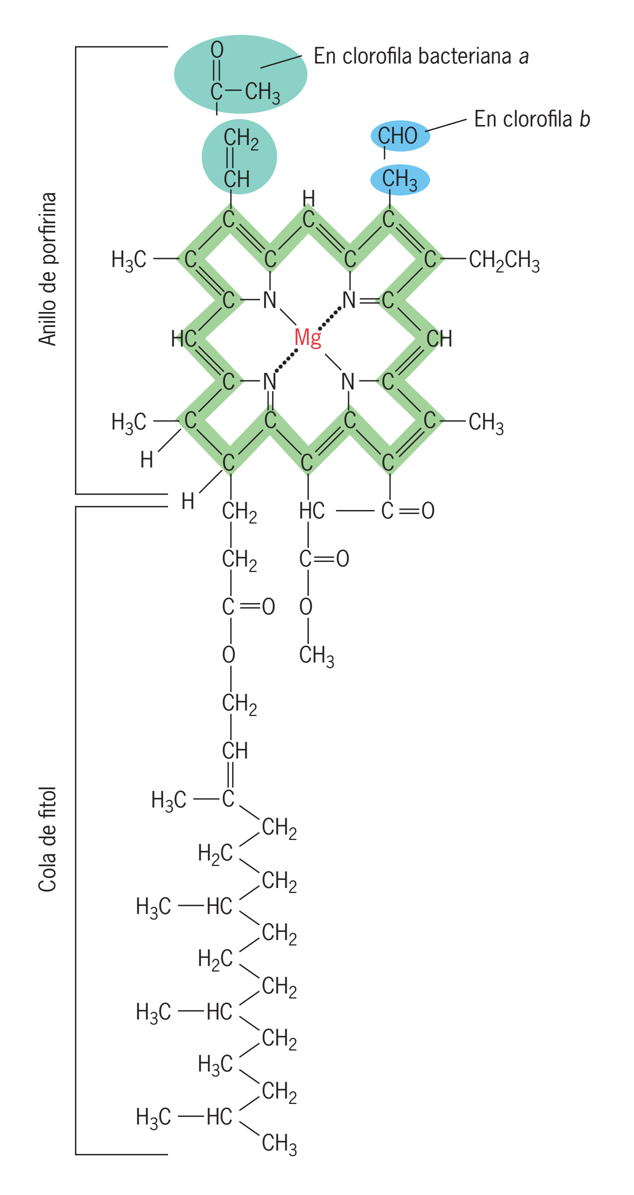


FIGURA 6-6 Estructura de la clorofila *a*. La molécula consiste en un anillo de porfirina (que a su vez se forma con cuatro anillos pirrólicos más pequeños) con un ion magnesio en el centro y una larga cola de hidrocarburo. La sombra verde alrededor del borde de la porfirina indica la deslocalización de electrones que forman una nube. La estructura de la porfirina con magnesio de la clorofila puede compararse con la porfirina con hierro del hemo mostrado en la figura 5-12. La clorofila *b* y la bacterioclorofila *a* contienen ciertas sustituciones, como se indica. Por ejemplo, el grupo —CH_3 del anillo II se sustituye por un grupo —CHO en la clorofila *b*. La clorofila *a* se encuentra en todos los organismos fotosintéticos productores de oxígeno, pero no en las diversas bacterias del azufre. Además de la clorofila *a*, la clorofila *b* está presente en todas las plantas superiores y las algas verdes. Otras que no se muestran son la clorofila *c*, presente en las algas cafés, diatomeas y ciertos protozoarios, así como la clorofila *d*, que se encuentra en las algas rojas. La bacterioclorofila sólo se halla en las bacterias verdes y púrpura, microorganismos que no producen O_2 durante la fotosíntesis.

aumenta aún más porque los pigmentos establecen relaciones no covalentes con diversos polipéptidos.

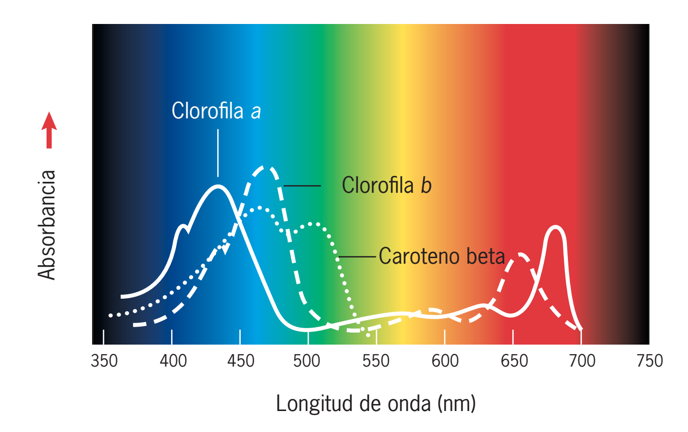


FIGURA 6-7 Espectro de absorción para varios pigmentos fotosintéticos de las plantas superiores. El fondo muestra los colores que el ser humano percibe para las longitudes de onda del espectro visible. Las clorofilas deben absorber con más intensidad en las regiones violeta-azul y roja del espectro, en tanto los carotenoides (p. ej., caroteno beta) también absorben en la región verde. Las algas rojas y las cianobacterias contienen pigmentos adicionales (ficobilinas) que absorben en las bandas intermedias del espectro.

Los organismos fotosintéticos contienen varias clases de clorofila que difieren entre sí por los grupos laterales unidos al anillo de porfirina. La figura 6-6 muestra las estructuras de estos pigmentos. Las clorofilas son los principales pigmentos fotosintéticos absorbentes de luz, pero las plantas terrestres también contienen pigmentos accesorios naranja y rojo llamados *carotenoides*. Este grupo comprende el caroteno beta, que es un sistema lineal de dobles enlaces conjugados:

Caroteno beta

Los carotenoides absorben la luz sobre todo de la región azul y verde del espectro (fig. 6-7), y reflejan las longitudes de onda de las regiones del amarillo, el naranja y el rojo. Los carotenoides producen los colores característicos de las zanahorias y las naranjas, así como el de las hojas de algunas plantas durante el otoño. Los carotenoides desempeñan múltiples funciones: actúan como recolectores secundarios de luz durante la fotosíntesis y extraen el exceso de energía de las moléculas excitadas de clorofila y la disipan como calor. Si los carotenoides no absorbieran este exceso de energía podría transferirse al oxígeno, lo que produciría una forma ultrarreactiva de la molécula denominada oxígeno sencillo ($^1O^*$) que puede destruir moléculas biológicas y causar la muerte celular.

Como la luz que incide sobre la hoja está compuesta por varias longitudes de onda, la presencia de pigmentos con distintas propiedades de absorción asegura que un mayor porcentaje de los fotones incidentes estimule la fotosíntesis. Esto puede verse si se examina un **espectro de acción** (fig. 6-8), que es una gráfica de la velocidad relativa (o eficiencia) de la fotosíntesis producida por la luz de varias longitudes de onda. A diferencia

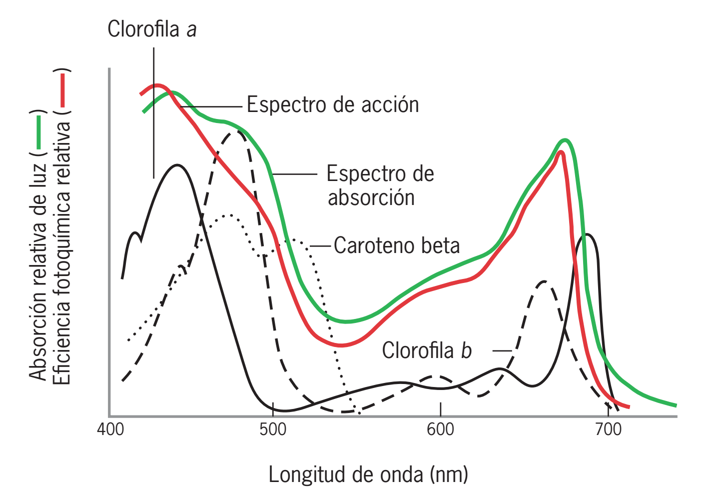


FIGURA 6-8 Espectro de acción para la fotosíntesis. El espectro de acción (representado por la línea roja) indica la eficiencia relativa con la que la luz de distintas longitudes de onda puede promover la fotosíntesis en las hojas de una planta. Puede generarse un espectro de acción si se mide el O_2 producido por las hojas después de la exposición a varias longitudes de onda. Las líneas negras indican los espectros de absorción de cada pigmento fotosintético principal. La línea verde muestra el espectro de absorción combinado de todos los pigmentos.

de un espectro de absorción, que sólo mide las longitudes de onda de la luz absorbida por pigmentos particulares, un espectro de acción identifica las longitudes de onda que son efectivas para inducir una respuesta fisiológica determinada. El espectro de acción para la fotosíntesis sigue muy de cerca al espectro de absorción de las clorofilas y los carotenoides, y refleja la participación de estos pigmentos en el proceso fotosintético.

REVISIÓN ?

1. ¿Cuál es la diferencia entre un espectro de absorción y un espectro de acción?
2. Comparar la estructura, la absorción y la función de las clorofilas y los carotenoides.

6.4 UNIDADES FOTOSINTÉTICAS Y CENTROS DE REACCIÓN

El año 1932, Robert Emerson y William Arnold del *California Institute of Technology* realizaron un experimento que sugería que no todas las moléculas de clorofila de un cloroplasto participaron en forma directa en la conversión de la energía lumínica en energía química. Estos investigadores usaron suspensiones del alga verde *Chlorella* sp. y luces centelleantes de duración en extremo corta para determinar la cantidad mínima de luz necesaria para obtener la producción máxima de oxígeno. Con base en el número de moléculas de clorofila presentes en la preparación, calcularon que se liberaba una molécula de oxígeno durante un destello breve de luz por cada 2 500 moléculas de clorofila presentes. Más tarde Emerson demostró que debe absorberse un mínimo de ocho fotones para producir una molécula de O_2, lo que significa que los cloroplastos contienen alrededor de 300 veces más moléculas de clorofila de lo que parecería necesario para oxidar el agua y generar O_2.

Una posible interpretación de este hallazgo es que sólo un porcentaje muy pequeño de moléculas de clorofila participa en la fotosíntesis, pero no es así. Por el contrario, varios cientos de moléculas de clorofila actúan juntas como una **unidad fotosintética** en la que sólo un miembro del grupo de **la clorofila del centro de reacción** transfiere en realidad electrones a un receptor. Aunque la mayor parte de las moléculas de pigmento no participa en *forma directa* en la conversión de energía lumínica en energía química, son las encargadas de la absorción de la luz. Estas moléculas de pigmento forman una **antena** recolectora de luz que absorbe fotones de diversas longitudes de onda y transfiere la energía (llamada *energía de excitación*) con gran rapidez a la molécula de pigmento en el centro de reacción.

La transferencia de la energía de excitación de una molécula de pigmento a otra es muy sensible a la distancia entre las moléculas. Las moléculas de clorofila de una antena se mantienen muy próximas entre sí (con menos de 1.5 nm de separación) mediante enlaces no covalentes entre los polipéptidos de las membranas. Una “regla” que opera entre los pigmentos de la antena es que la energía sólo puede transferirse a una molécula que requiere una energía igual o menor. En otras palabras, la energía nada más puede pasarse a una molécula de pigmento que absorbe luz de igual o mayor longitud de onda (menor energía) que la absorbida por la molécula donante. Conforme la energía “recorre” la unidad fotosintética (fig. 6-9), se transfiere de manera repetida a una molécula de pigmento que absorbe

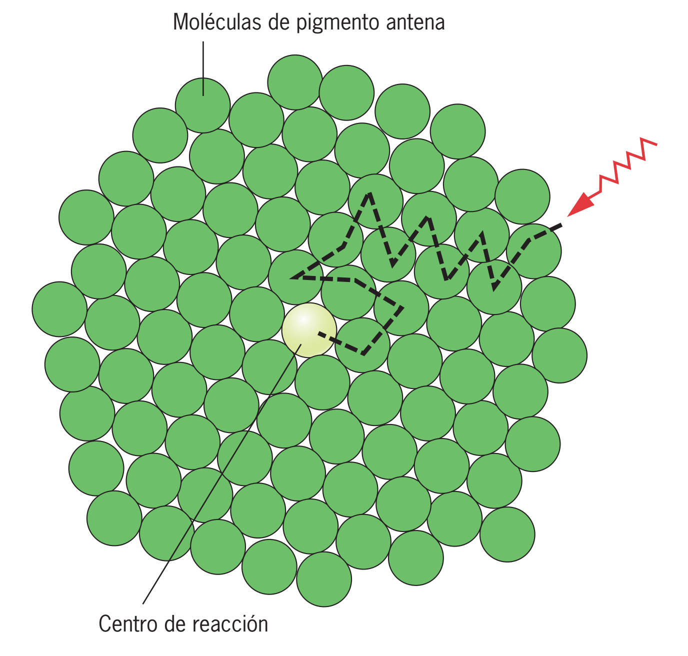


FIGURA 6-9 Transferencia de la energía de excitación. La energía se transfiere al azar por una red de moléculas de pigmento que absorben luz con longitud de onda cada vez mayor hasta que la energía llega a una clorofila en el centro de reacción, la cual transfiere un electrón excitado a un receptor primario, como se describe más adelante en este capítulo.

una longitud de onda mayor. Al final la energía se transfiere a una clorofila del centro de reacción, la cual absorbe luz con mayor longitud de onda que cualquiera de sus vecinas. Una vez que el centro de reacción recibe la energía, el electrón excitado por la absorción de la luz puede transferirse a su receptor.

Formación de oxígeno: coordinación de la actividad de dos sistemas fotosintéticos diferentes

La evolución de los organismos capaces de utilizar H_2O como fuente de electrones se acompañó de grandes cambios en la maquinaria fotosintética. La razón de estos cambios se revela al considerar las características energéticas de la fotosíntesis oxigénica (liberadora de O_2). La pareja O_2-H_2O contiene un potencial redox estándar de +0.82 V, mientras que el de la pareja $NADP^+$-NADPH es –0.32 V (cuadro 5-1, pág. 190). La diferencia entre los potenciales redox de estas dos parejas (1.14 V) proporciona una medida de la energía mínima que el sistema debe absorber para retirar un electrón del agua y pasarlo al $NADP^+$ *bajo condiciones estándar.* Sin embargo, las células no operan en condiciones estándar y la transferencia de electrones de H_2O a $NADP^+$ requiere más que el ingreso mínimo de energía. Se estima que durante las operaciones reales en el cloroplasto se utilizan más de 2 V de energía para efectuar esta reacción de oxidación-reducción. (Este valor de 2 V se estimó a partir de la escala que está al lado izquierdo de la figura 6-10, que va de menos de +1 V a más de –1 V.) En la página 219 se señaló que un mol de fotones con longitud de onda de 680 nm (luz roja) equivale a un cambio en el potencial redox de 1.8 V. Por tanto, aunque en teoría es posible que un fotón de luz roja impulse un electrón al nivel energético necesario para reducir $NADP^+$ en condiciones estándar (es decir, 1.14 V), el proceso se realiza en la célula mediante la acción combinada de dos reacciones distintas para absorber la luz.

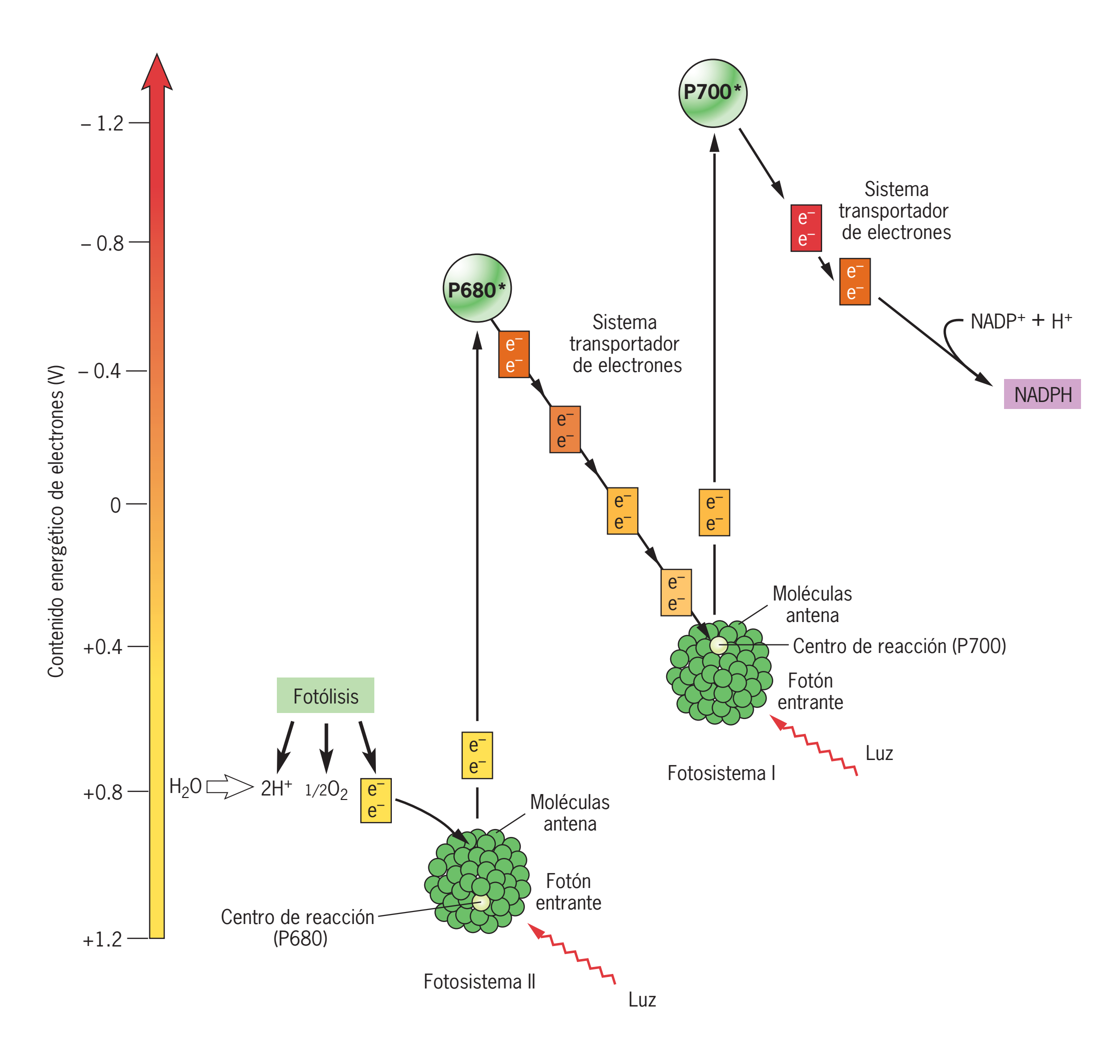


FIGURA 6-10 Una revisión del flujo de electrones durante las reacciones dependientes de la luz de la fotosíntesis. Los fenómenos que se muestran en este esquema se describen con detalle en las páginas siguientes. El contenido energético de los electrones se presenta en voltios. Para convertir estos valores en calorías, se multiplican por la constante de Faraday, 23.06 kcal/V. Por ejemplo, una diferencia de 2.0 V corresponde a una diferencia energética de 46 kcal/mol de electrones. Esto puede compararse con la energía de la luz roja (680 nm), que contiene alrededor de 42 kcal/mol de fotones.

Las reacciones de la fotosíntesis en las que se absorbe luz ocurren en complejos pigmento-proteína llamados **fotosistemas**. Se requieren dos tipos de fotosistemas para catalizar las dos reacciones de absorción lumínica empleadas en la fotosíntesis oxigénica. Un fotosistema, el **fotosistema II (PSII)**, impulsa los electrones de un nivel energético inferior al del agua hasta un punto en la mitad del camino (fig. 6-10). El otro fotosistema, el **fotosistema I (PSI)**, eleva los electrones desde el punto intermedio hasta un nivel energético mucho mayor al del $NADP^+$. Los dos fotosistemas actúan en serie, o sea, uno después del otro. Aunque tienen reacciones fotoquímicas muy distintas, los dos tipos de fotosistemas de las plantas, así como los de las células bacterianas fotosintéticas, tienen notables similitudes en la composición proteica y la arquitectura general. Estas propiedades compartidas sugieren que todos los centros de reacción fotosintética evolucionaron a partir de una sola estructura ancestral común que se ha conservado durante más de tres mil millones de años.

El centro de reacción del fotosistema II es un dímero de clorofila conocido como **P680**, la "P" se refiere a "pigmento" y el número "680" representa la longitud de onda de la luz que este par de clorofilas absorbe con mayor intensidad. El centro de reacción del fotosistema I también es un dímero de clorofila y se conoce como **P700** por razones similares. Cuando la luz del sol incide sobre una membrana tilacoide, los pigmentos de la antena del PSII y el PSI absorben la energía y la pasan a los centros de reacción de ambos fotosistemas. Los electrones del centro de reacción de ambos pigmentos se impulsan hasta un orbital más externo y cada electrón se transfiere a un **receptor electrónico primario**. Después de perder sus electrones, las clorofilas del centro de reacción del PSII y el PSI se convierten en los pigmentos con carga positiva conocidos como $P680^+$ y $P700^+$, respectivamente. Los receptores de los electrones adquieren cargas negativas a su vez. En esencia esta separación de carga dentro de los fotosistemas es la reacción lumínica: la conversión de energía lumínica en energía química. Los centros de reacción con carga positiva actúan como atrayentes para los electrones y los receptores con carga negativa lo hacen como donantes de electrones. Por consiguiente, la separación de la carga dentro de cada fotosistema establece la base para el flujo de electrones a lo largo de una cadena de portadores específicos.

En la fotosíntesis oxigénica, en la que dos fotosistemas actúan en serie, el flujo de electrones ocurre a lo largo de tres ramas, del agua al PSII, del PSII al PSI y del PSI a $NADP^+$, una disposición descrita como esquema en Z que Robert Hill y Fay Bendall de la *Cambridge University* propusieron por primera vez. La figura 6-10 muestra un esbozo general del esquema Z; los nombres de los componentes específicos se completarán cuando se examine cada una de las principales partes de esta vía. Como los miembros de la cadena respiratoria en la mitocondria (cap. 5), casi todos los portadores electrónicos del esquema Z se encuentran como parte de grandes complejos proteicos de membrana (véase fig. 6-16). Con los años los investigadores han desarrollado retratos cada vez más detallados de las estructuras de estos complejos. Estos esfuerzos culminaron en los últimos años con la publicación de las estructuras de ambos fotosistemas obtenidas mediante cristalografía de rayos X por varios laboratorios, con resolución cada vez mayor.

Como en la mitocondria, la transferencia de electrones libera energía, utilizada para establecer un gradiente de protones, que a su vez impulsa la síntesis de ATP. Como se explica en la página 228, el ATP producido en el cloroplasto se emplea sobre todo dentro del organelo para la síntesis de carbohidratos; el ATP que se usa fuera del cloroplasto proviene en especial del que elaboran las mitocondrias de la célula vegetal.

Operaciones del PSII: obtención de electrones mediante la separación del agua El fotosistema II utiliza la energía lumínica absorbida para realizar dos actividades relacionadas: extracción de electrones del agua y generación de un gradiente de protones. El PSII de las células vegetales es un complejo con más de 20 polipéptidos distintos, la mayor parte de los cuales está incluida en la membrana tilacoide. Dos de estas proteínas, designadas D1 y D2, tienen una importancia particular porque juntas se unen con el dímero de clorofila P680 del centro de reacción y los cofactores que participan en el transporte de electrones a través del fotosistema (fig. 6-11).

El primer paso en la activación del PSII es la absorción de luz en un pigmento antena. Casi todos los pigmentos de la antena que reúnen luz para el PSII se encuentran en un complejo pigmento-proteína diferente denominado **complejo II para recolección de luz**, o **LHCII**. Las proteínas del LHCII se unen con las clorofilas y los carotenoides, y se sitúan fuera del centro del fotosistema (fig. 6-11*a*). Como se explica en la sección Vías experimentales, que puede encontrarse en la dirección de Internet *www.wiley.com/college/karp*, el LHCII no siempre se relaciona con el PSII, sino que en las condiciones apropiadas puede migrar por la membrana tilacoide y vincularse con el PSI, donde también sirve como complejo recolector de luz para el centro de reacción del fotosistema I.

El flujo de electrones del PSII a la plastoquinona. La energía de excitación pasa de los pigmentos de la antena externa del LHCII a una pequeña cantidad de moléculas de clorofila de la parte interior de la antena situada en el centro del PSII. A partir de ahí la energía se transfiere al centro de reacción del PSII. El pigmento excitado del centro de reacción (P680*) responde con la transferencia de un solo electrón excitado por la luz a una molécula cercana de feofitina, similar a la clorofila (paso 1, fig. 6-11*a*), que es el principal receptor de electrones. Esta transferencia de electrones genera una separación de la carga en PSII entre un donante de carga positiva ($P680^+$) y un receptor de carga negativa (Feo^-). La importancia de la formación de dos especies con cargas opuestas, $P680^+$ y Feo^-, se vuelve más evidente cuando se consideran las capacidades de oxidación-reducción de estas dos especies. $P680^+$ es deficiente en electrones y puede aceptar electrones, lo que lo convierte en un agente oxidante. En contraste, Feo^- tiene un electrón adicional fácil de desprender, lo que lo convierte en un agente reductor. Este fenómeno, la formación impulsada por luz de un agente oxidante y uno reductor, tarda menos de una milmillonésima de segundo y es el primer paso esencial de la fotosíntesis.

Puesto que tienen cargas opuestas, $P680^+$ y Feo^- presentan una reactividad obvia entre sí. La interacción entre las especies de cargas opuestas se impide con la separación de las cargas, hasta los lados opuestos de la membrana, mediante el paso por varios sitios diferentes. Primero Feo^- transfiere su electrón (paso 2, fig. 6-11*a*) a una molécula de plastoquinona (PQ_A en la fig. 6-11*a*) unida cerca del lado externo (estromal) de la membrana.

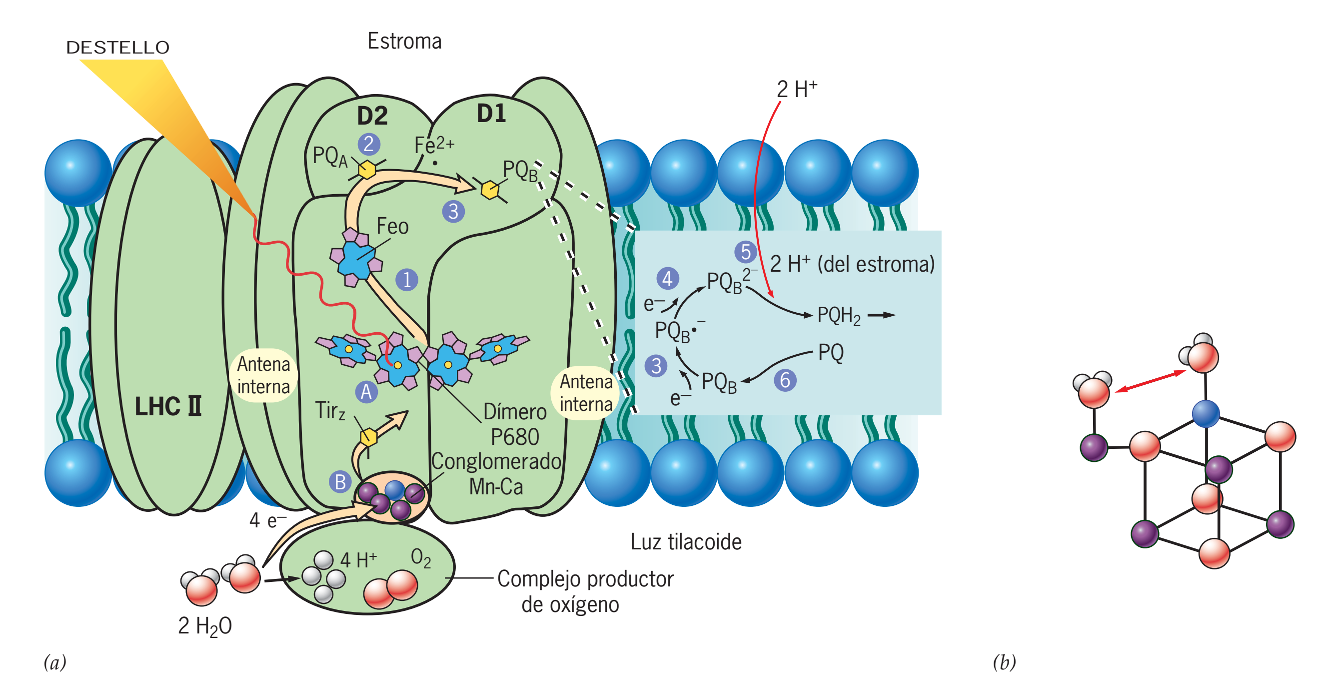


FIGURA 6-11 Organización funcional del fotosistema II. *a*) Modelo simplificado del enorme complejo proteína-pigmento que cataliza la oxidación del agua impulsada por luz y la reducción de la plastoquinona. Las flechas amarillas indican el trayecto que los electrones siguen. Los fenómenos inician con la absorción de luz por un pigmento antena en el complejo recolector de luz externo (LHCII). La energía se transfiere del LHCII por un complejo interno pigmento-proteína de la antena a una clorofila *a* del centro de reacción P680, que es una de las cuatro moléculas de clorofila muy próximas (el dímero P680 y dos moléculas accesorias de clorofila *a*). La absorción de esta energía en P680 excita un electrón, que se transfiere a la feofitina (Feo) (paso 1), el receptor primario de electrones del PSII. (La feofitina es una molécula de clorofila que carece del ion Mg^{2+}). El electrón pasa después a la plastoquinona PQ_A (paso 2) y luego por un Fe^{2+} no hemo a PQ_B (paso 3) para formar un radical libre $PQ_B^{\cdot -}$ de carga negativa. La absorción de un segundo fotón envía un segundo electrón por la misma vía, lo que convierte el receptor en PQ_B^{2-} (paso 4). Entonces dos protones entran desde el estroma (paso 5) y generan PQH_2, que se libera a la bicapa lipídica y se sustituye con una nueva molécula oxidada de PQ_B (paso 6). Mientras estos fenómenos ocurren, los electrones se mueven de H_2O mediante Tir_z al pigmento del centro de reacción con carga positiva (pasos B y A). Por tanto, de manera global, PSII cataliza la transferencia de electrones del agua a la plastoquinona. La oxidación de dos moléculas de H_2O para liberar una molécula de O_2 genera dos moléculas de PQH_2. Como la oxidación del agua libera protones hacia la luz tilacoide y la reducción de PQ_B^{2-} retira protones del estroma, la operación de PSII contribuye de manera muy importante al establecimiento del gradiente de H^+. La figura muestra un monómero de un complejo dimérico del fotosistema II. *b*) Organización propuesta de iones metálicos en el sitio de oxidación de agua, basada en datos de espectroscopia y cristalografía de rayos X. En este modelo, tres iones Mn y un ion Ca (así como cuatro átomos de oxígeno) están dispuestos formando parte de un cúmulo cuboide con un puente hacia un cuarto ion Mn en un sitio cercano. Una de las moléculas de agua sustrato está unida al cuarto ion Mn y la otra molécula de agua sustrato está unida al ion Ca. La reacción entre los átomos de oxígeno y las dos moléculas de agua (flecha roja) conduce a la formación de un enlace O═O. Mn, pardo; Ca, azul; O, rojo.

La plastoquinona (PQ) es una molécula liposoluble (fig. 6-12) con estructura similar a la ubiquinona (véase fig. 5-12*c*). El electrón de PQ_A se transfiere (paso 3, fig. 6-11*a*) a una segunda plastoquinona (PQ_B en la figura 6-11) para producir una forma semirreducida de la molécula ($PQ_B^{\cdot -}$) que permanece unida con firmeza a la proteína D1 del centro de reacción. El electrón se acerca al lado estromal de la membrana con cada una de estas transferencias.

El pigmento con carga positiva ($P680^+$) se reduce de nuevo a P680 (como se describe más adelante), lo que inhibe el centro de reacción para la absorción de otro fotón. La absorción de un segundo fotón envía un segundo electrón energizado mediante la vía de P680 a feofitina, a PQ_A, a ($PQ_B^{\cdot -}$), y se forma PQ_B^{2-} (paso 4, fig. 6-11), que se combina con dos protones para formar plastoquinol, PQH_2 (paso 5, fig. 6-11*a*; fig. 6-12). Los protones utilizados en la formación de PQH_2 provienen del estroma, lo que causa un descenso en la concentración de H^+ en el estroma que contribuye a la formación del gradiente de protones. La molécula de PQH_2 reducida se separa de la proteína D1 y se difunde a la bicapa lipídica. El PQH_2 se sustituye por una molécula de PQ completamente oxidada proveniente de una pequeña "reserva" de moléculas de plastoquinona en la bicapa (paso 6, fig. 6-11*a*). El destino de los electrones (y los protones) que el plastoquinol porta se describe en la sección siguiente.

El flujo de electrones del agua al PSII. La parte menos conocida del flujo de electrones del agua al $NADP^+$ es el primer paso entre H_2O y el PSII. El agua es una molécula muy estable formada por átomos de hidrógeno y oxígeno unidos con firmeza. De hecho la división del agua es la reacción que implica el mayor desafío termodinámico (endergónica) de todas las que se conocen en los organismos vivos. Para separar el agua en el laboratorio se requiere una corriente eléctrica o temperaturas que se aproximan a 2 000°C. Aun así la célula vegetal puede realizar esta hazaña en la ladera nevada de una montaña sólo con la energía de la luz visible.

Plastoquinona

$1e^-$

$1e^-$

$2H^+$

Plastoquinol

FIGURA 6-12 Plastoquinona. La aceptación de dos electrones y dos protones reduce PQ (plastoquinona) a PQH_2 (plastoquinol). Los intermediarios son similares a los que se muestran en la figura 5-12*c* para la ubiquinona de la mitocondria.

En la sección previa se revisó cómo la absorción de luz en el PSII conduce a la formación de dos moléculas cargadas, $P680^+$ y Feo^-. Se siguió la ruta del electrón excitado relacionado con Feo^-, y ahora se describirá la otra especie, $P680^+$, que es el agente oxidante más potente descubierto en un sistema biológico. El potencial redox de la forma oxidada de P680 es suficientemente fuerte para extraer electrones unidos con firmeza (de baja energía) del agua (potencial redox +0.82 V), con lo que la molécula se divide. La separación del agua durante la fotosíntesis se llama **fotólisis**. Se cree que la formación de una molécula de oxígeno durante la fotólisis requiere la pérdida *simultánea* de cuatro electrones de dos moléculas de agua de acuerdo con la reacción

$$2\,H_2O \xrightarrow{\text{4 fotones}} 4\,H^+_{luz} + O_2 + 4\,e^- \quad \text{(reacción general del PSII)}$$

Aun así, un centro de reacción del PSII sólo puede generar una carga positiva ($P680^+$), o equivalente oxidante, por vez. Alrededor de 1970 Pierre Joliot y Bessel Kok propusieron una solución a este problema, la hipótesis del estado S, que permite al fotosistema acumular los cuatro equivalentes oxidantes necesarios para oxidar el agua. En relación estrecha con la proteína D1 del PSII en su superficie luminal se encuentra un conjunto de cuatro iones de manganeso (Mn) estabilizado y protegido por varias proteínas periféricas que forman el *complejo desarrollador de oxígeno* (fig. 6-11*a*). En la figura 6.11*b* se presenta una propuesta de organización del conglomerado Mn-Ca. Éste acumula cuatro equivalentes oxidantes mediante la transferencia de cuatro electrones, uno por vez, al $P680^+$ cercano. La transferencia de cada electrón del conjunto de Mn a $P680^+$ (pasos B y A de la figura 6-11) se realiza mediante el paso por un portador intermedio de electrones, un residuo de tirosina en la proteína D1, llamado Tir_z. Luego de transferir cada electrón a $P680^+$ y regenerar el P680, el pigmento se oxida de nuevo (a $P680^+$) después de la absorción de otro fotón por el fotosistema. Por tanto la acumulación por pasos de los cuatro equivalentes oxidantes por el conjunto de Mn es impulsada por la absorción sucesiva de cuatro fotones de luz por el PSII. Una vez que esto ocurre, el sistema ya puede catalizar la eliminación de 4 e^- de dos moléculas H_2O (fig. 6-11*b*), como se indica en el esquema siguiente:

$$4\,H^+ + O_2 \quad 2\,H_2O \qquad 4\,e^-$$

$$S_0 \xrightarrow{h\nu} S_1 \xrightarrow{h\nu} S_2 \xrightarrow{h\nu} S_3 \xrightarrow{h\nu} S_4$$

donde el subíndice de S indica el número de equivalentes oxidantes almacenados por el grupo Mn-Ca. La primera prueba de la acumulación de equivalentes oxidantes sucesivos se obtuvo exponiendo células de algas con destellos muy breves (1 μseg) de luz (fig. 6-13). En esta gráfica puede verse que la producción de O_2 es máxima después de cada cuarto destello de luz, lo cual indica que debe acumularse el efecto de cuatro fotorreacciones individuales antes de que pueda liberarse O_2.

Los protones que se producen en la reacción de fotólisis se retienen en la luz tilacoide (fig. 6-11), donde contribuyen al gradiente de protones. Los cuatro electrones producidos en la reacción de fotólisis sirven para regenerar el cúmulo de Mn reducido (estado S_0), mientras se libera O_2 hacia el ambiente como producto de desecho.

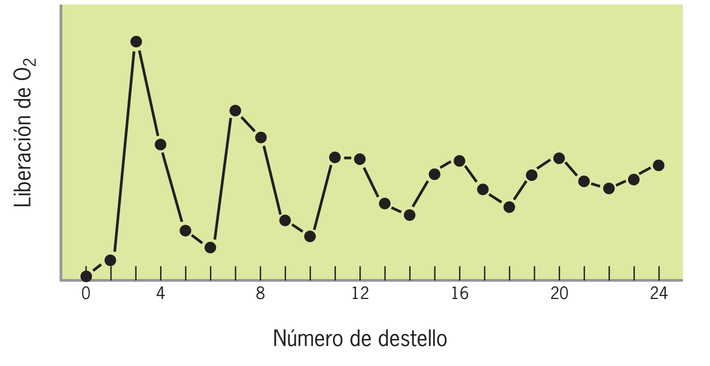


FIGURA 6-13 Medición de la cinética de la liberación de O_2. La gráfica muestra la respuesta de cloroplastos aislados que se mantuvieron en la oscuridad cuando se exponen a una sucesión de destellos luminosos de muy corta duración. La cantidad de oxígeno liberado alcanza su nivel máximo con cada cuarto destello de luz. El primer pico ocurre después de tres destellos (en lugar de cuatro) porque la mayor parte del cúmulo de manganeso se encuentra en estado S_1 (un equivalente oxidante) cuando se mantienen en la oscuridad. Las oscilaciones se amortiguan conforme el número de destellos aumenta.

Antes de dejar el tema del PSII cabe señalar que la actividad y la integridad de este fotosistema pueden afectarse de manera negativa con luz muy intensa. Este fenómeno se denomina *fotoinhibición*. La formación de un agente oxidante muy fuerte y el peligro siempre presente de que se formen especies de oxígeno muy tóxicas brindan al PSII la posibilidad de que se autodestruya como resultado de la excitación excesiva del sistema. La mayor parte del daño parece dirigirse al polipéptido (D1) que une los centros de redox activos y el cúmulo de Mn-Ca del fotosistema. Los cloroplastos contienen un mecanismo para la degradación proteolítica selectiva de D1 y su remplazo con una molécula de polipéptido recién sintetizada.

Del PSII al PSI Ya se describió cómo la absorción sucesiva de dos fotones en el centro de reacción del PSII conduce a la formación de una molécula de PQH_2 reducida por completo. En consecuencia, la producción de una sola molécula de O_2, que requiere la absorción de cuatro fotones en el PSII, conduce a la formación de dos moléculas de PQH_2. El PQH_2 es un portador móvil de electrones que se difunde a través de la bicapa lipídica de la membrana tilacoide y se une con un gran complejo de proteínas múltiples llamado *citocromo* b_6f (fig. 6-14). El citocromo b_6f es similar en estructura y función al citocromo bc_1 de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria (pág. 196). Ambos complejos comparten los mismos grupos redox, ambos pueden intoxicarse con algunos de los mismos inhibidores y ambos participan en un ciclo Q que traslada 4 H^+ por cada par de electrones. Como estos protones provienen originalmente del estroma, su liberación hacia la luz constituye un movimiento de protones a través de la membrana tilacoide (véase fig. 6-16*b*). Los electrones del citocromo b_6f se pasan a otro portador móvil de electrones, una proteína periférica hidrosoluble que contiene cobre conocida como *plastocianina*, situada en el lado luminal de la membrana tilacoide (fig. 6-14). La plastocianina transporta electrones al lado luminal del PSI, donde se transfieren a $P700^+$ el pigmento con carga positiva del centro de reacción del fotosistema I.

Debe tenerse presente que todas las transferencias de electrones descritas son exergónicas y ocurren cuando los electrones pasan a portadores con afinidad cada vez mayor por los electrones (potenciales redox más positivos, pág. 190). La necesidad de portadores móviles de electrones, como PQH_2 y plastocianina, se evidenció cuando se descubrió que los dos tipos de fotosistemas (PSII y PSI) no se hallan próximos entre sí en la membrana, sino bastante separados por distancias cercanas a 0.1 μm. Los experimentos que condujeron al descubrimiento se describen con detalle en la sección Vías experimentales del capítulo 6, que puede encontrarse en la dirección de Internet *www.wiley.com/college/karp*.

Operaciones del PSI: producción de NADPH El PSI de las plantas superiores consiste en un centro de reacción central formado hasta por 12 a 14 subunidades polipeptídicas y un complejo periférico de pigmentos unidos a proteína llamado LHCI. La energía lumínica es absorbida por los pigmentos antena del LHCI y pasa al pigmento del centro de reacción del PSI, P700, que es un dímero de clorofila *a* (fig. 6-15). Tras la absorción de energía, un pigmento excitado del centro de reacción (P700*) transfiere un electrón a una molécula monomérica separada de clorofila *a* (designada A_0), que actúa como el principal receptor

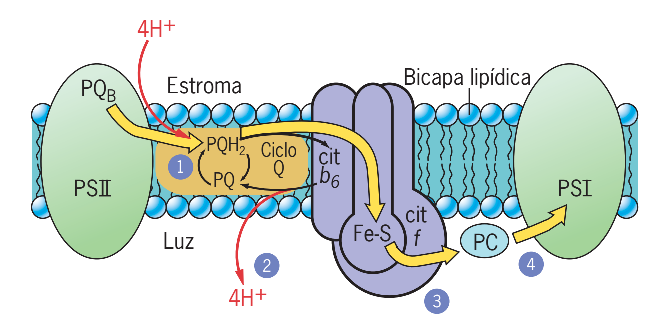


FIGURA 6-14 Transporte de electrones entre PSII y PSI. La flecha amarilla indica el flujo de un par de electrones. El citocromo b_6f opera en forma muy similar al citocromo bc_1 en la mitocondria y participa en un ciclo Q (no explicado en el texto) que traslada cuatro protones por cada par de electrones que se mueve por el complejo. El PQH_2 y la plastocianina (PC) son portadores móviles que pueden transportar electrones entre fotosistemas muy separados.

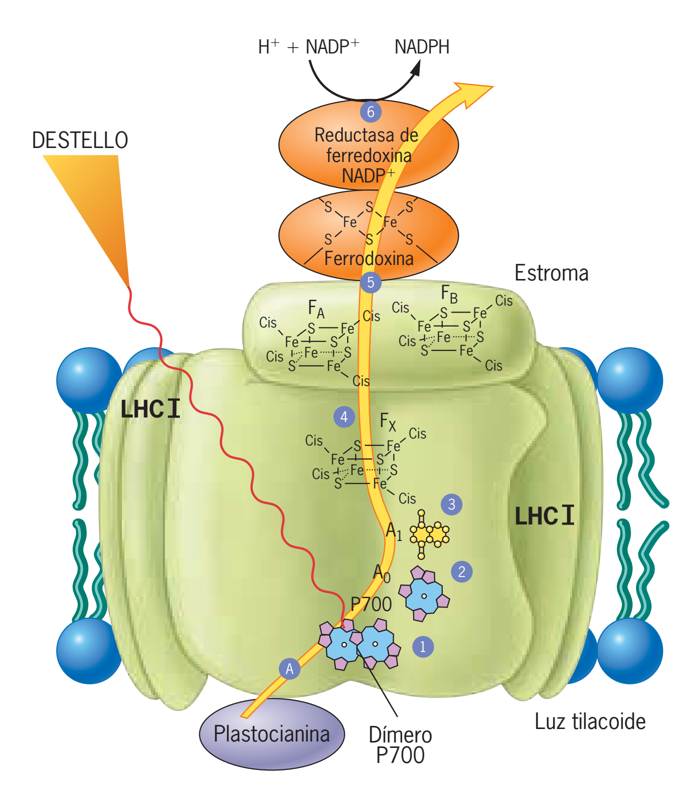


FIGURA 6-15 Organización funcional del fotosistema I. La trayectoria seguida por los electrones se indica mediante una flecha amarilla. Los sucesos comienzan con la absorción de luz por un pigmento antena y con la transferencia de energía a una clorofila P700 en el centro de reacción del PSI. La absorción de energía en P700 excita un electrón que se transfiere (paso 1) a A_0, el receptor primario de electrones de este fotosistema. El electrón pasa después a A_1 (paso 2) y luego a un centro de hierro-azufre llamado F_X (paso 3). De F_X, el electrón se transfiere por dos centros más de hierro-azufre (F_A y F_B), que se unen mediante una proteína periférica al lado estromal de la membrana. Al final el electrón se transfiere a la ferredoxina, una pequeña proteína con hierro-azufre (paso 5) externa al complejo PSI. Cuando dos moléculas diferentes de ferredoxina aceptaron un electrón, actúan juntas para reducir una molécula de $NADP^+$ a NADPH (paso 6). El pigmento del centro de reacción deficiente en electrones ($P700^+$) se reduce con un electrón donado por la plastocianina (paso A).

de electrones (paso 1, fig. 6-14). Como en el PSII, la absorción de luz conduce a la producción de dos especies cargadas, en este caso $P700^+$ y A_0^-. A_0^- es un agente reductor muy fuerte con un potencial redox cercano a –1.0 V, mucho mayor que el necesario para reducir el $NADP^+$ (potencial redox de –0.32 V). Esta carga positiva del pigmento $P700^+$ se neutraliza con un electrón donado por la plastocianina, como se mencionó antes.

La separación inicial de la carga en el PSI se estabiliza mediante el paso del electrón de A_0^- a través de varios cofactores, a partir de un tipo de quinona llamada *filoquinona* (designada A_1) y tres cúmulos de hierro-azufre (denominados F_X, F_B y F_A) (pasos 2 a 4, fig. 6-15). La oxidación de P700 en $P700^+$ ocurre en el lado luminal de la membrana. Como se indica en la figura 6-15, el electrón que se pierde al receptor primario pasa a través del PSI a los centros de hierro-azufre unidos en el lado estromal de la membrana. Después el electrón se transfiere del PSI a una pequeña proteína hidrosoluble con hierro-azufre llamada *ferredoxina* (paso 5, fig. 6-15) que se relaciona con la superficie estromal de la membrana. La reducción de $NADP^+$ para formar NADPH (paso 6, fig. 6-15) es una reacción catalizada por una enzima grande llamada reductasa de ferredoxina-$NADP^+$, que contiene un grupo prostético FAD capaz de aceptar y transferir dos electrones (pág. 191). Una sola molécula de ferredoxina puede donar sólo un electrón, de manera que dos ferredoxinas actúan juntas en la reducción:

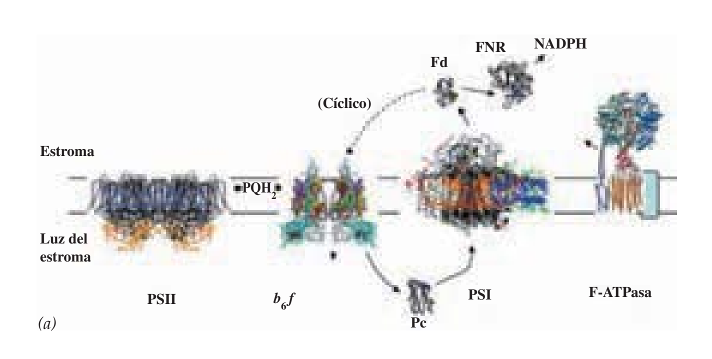
$$2\ \text{Ferredoxina}_{red} + H^+ + NADP^+ \xrightarrow{\text{Reductasa de ferredoxina–NADP}^+} 2\ \text{Ferredoxina}_{ox} + NADPH$$

La eliminación de un protón del estroma también se agrega al gradiente de protones a través de la membrana tilacoide. La reacción completa del PSI basada en la absorción de cuatro fotones como se hizo para el PSII es:

$$4\ e^- + 2\ H^+_{estroma} + 2\ NADP^+ \xrightarrow{\text{4 fotones}} 2\ NADPH \quad \text{(reacción general del PSI)}$$

No todos los electrones que pasan a la ferredoxina terminan siempre en el NADPH; pueden tomarse vías alternativas según el organismo y las condiciones particulares. Por ejemplo, los electrones del PSI pueden usarse para reducir varios receptores inorgánicos. Estas vías para los electrones pueden conducir a la reducción final del nitrato (NO_3^-) en amoniaco (NH_3), o del sulfato (SO_4^{2-}) en sulfhidrilo (—SH), ingredientes clave de las moléculas biológicas. Por tanto la energía de la luz solar no sólo se usa para reducir los átomos de carbono más oxidados (los del CO_2), sino también para reducir las formas muy oxidadas de átomos de nitrógeno y azufre.

Revisión del transporte fotosintético de electrones En la figura 6-16*a* se muestra la estructura molecular de los principales componentes implicados en las reacciones fotodependientes de la membrana tilacoidal. El conocimiento de estas estructuras ha sido invaluable para dilucidar muchos de los misterios de la fotosíntesis a nivel molecular. Si se revisa de nuevo el proceso completo del transporte electrónico que ocurre durante la foto-



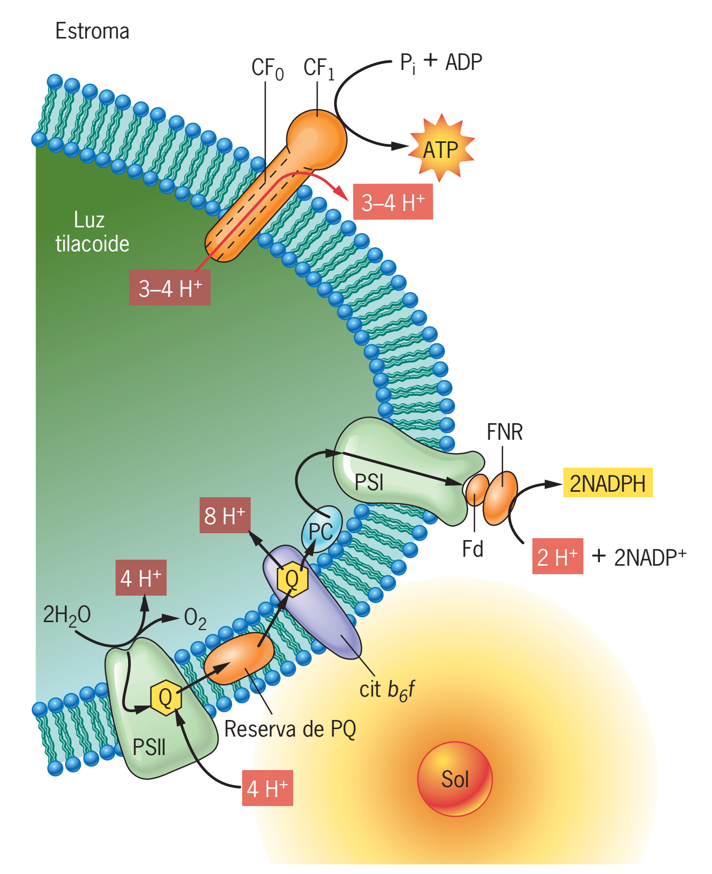


FIGURA 6-16 Resumen de las reacciones dependientes de la luz. *a*) Estructuras tridimensionales de las proteínas de la membrana tilacoidal que realizan las reacciones fotodependientes de la fotosíntesis. De los cuatro complejos proteínicos principales, PSII y citocromo b_6f están presentes en la membrana como dímeros, mientras que PSI y sintetasa de ATP (mostrada con mayor detalle en la figura 5-23) están presentes como monómeros. *b*) Resumen del flujo de electrones de H_2O a NADPH a través de los tres complejos de membrana. Esta figura muestra la cantidad estimada de protones que se trasladan por la membrana como resultado de la oxidación de dos moléculas de agua, lo que produce dos pares de electrones. También se muestra la sintetasa de ATP de las membranas tilacoides (véase sección 5.5 para obtener una descripción de la enzima que sintetiza ATP). La síntesis de cada molécula de ATP requiere tres a cuatro protones (pág. 206). FNR, reductasa de $NADP^+$-ferredoxina; Q, quinona (PQ). (A, REIMPRESA CON PERMISO DE NATHAN NELSON Y ADAM BEN-SHEM, NATURE REVS. MOL. CELL BIOL. 5:973, 2004. COPYRIGHT 2004, MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)

síntesis oxigénica (resumida en la figura 6-16) puede verse que los electrones viajan del agua a $NADP^+$ por la acción de dos fotosistemas absorbentes de luz. Los fenómenos que ocurren en el PSII generan un agente oxidante fuerte capaz de producir O_2 a partir de agua, mientras que los fenómenos en el PSI generan un fuerte agente reductor capaz de producir NADPH a partir de $NADP^+$. Estos dos fenómenos se encuentran en extremos opuestos de la química de redox en los organismos vivos. Como se menciona en la página 225, la producción de una molécula de O_2 requiere la extracción de cuatro electrones de dos moléculas de agua. El retiro de cuatro electrones del agua demanda la absorción de cuatro fotones, uno por cada electrón. Al mismo tiempo, la reducción de una molécula de $NADP^+$ requiere la transferencia de dos electrones. Por tanto, en teoría, si sólo un fotosistema pudiera transferir electrones del H_2O a $NADP^+$, cuatro fotones serían suficientes para producir dos moléculas de NADPH. Como se utilizan dos fotosistemas en la célula, ese número se duplica a ocho, cuatro que se emplean en el PSII y cuatro más en el PSI. En otras palabras, la célula debe absorber un total de ocho moles de fotones para generar un mol de oxígeno molecular y dos moles de NADPH. En consecuencia, si se suman las reacciones del PSII (pág. 225) y PSI (véase antes), *y se ignoran los protones por un momento*, se llega a una conclusión general para las reacciones lumínicas de

$$2\,H_2O + 2\,NADP^+ \xrightarrow{\text{8 fotones}} 1\,O_2 + 2\,NADPH$$
(reacción general)

Además, las reacciones lumínicas de la fotosíntesis establecen un gradiente de protones a través de la membrana tilacoide que conduce a la formación de ATP. El gradiente de protones se forma como resultado de la extracción de H^+ del estroma y la adición de H^+ a la luz del tilacoide. Las contribuciones al gradiente de protones (mostradas en la figura 6-16) surgen de: a) la división del agua en la luz; b) la translocación de plastoquinol (PQH_2) del lado estromal al lado luminal con oxidación posterior por el citocromo $b_6 f$, lo que libera protones, y c) la reducción de $NADP^+$ en el estroma.

Destrucción de hierbas mediante inhibición del transporte de electrones

Las reacciones lumínicas de la fotosíntesis emplean un número considerable de portadores de electrones que sirven como blancos para diversos productos que destruyen plantas (herbicidas). Varios herbicidas usuales, inclusive el diurón, la atracina y la terbutrina, actúan al unirse con una proteína central del PSII. En la página 224 se explica cómo la absorción de luz en el PSII conduce a la producción de una molécula de PQH_2 que luego se libera del sitio Q_B del PSII y se sustituye por una PQ de la reserva. Los herbicidas mencionados actúan mediante la unión con el sitio Q_B abierto después de la liberación de PQH_2, lo que bloquea el transporte de electrones por el PSII. El paraquat recibió la atención en los medios de comunicación porque se utiliza para destruir plantas de marihuana y porque sus residuos son muy tóxicos para los humanos. Éste interfiere con la función del PSI por medio de la competencia con la ferredoxina por los electrones del centro de reacción del PSI. Los electrones que se desviaron al paraquat se trasladan luego al O_2, lo que genera radicales de oxígeno muy reactivos (pág. 34) que dañan los cloroplastos y matan la planta. El paraquat destruye el tejido humano mediante la generación de radicales de oxígeno con los electrones desviados del complejo I de la cadena respiratoria (pág. 194).

REVISIÓN

1. ¿Cuál es la relación entre el contenido de energía de un fotón y la longitud de onda de la luz? ¿Cómo es que la longitud de onda de la luz determina si la fotosíntesis se estimula o no? ¿Cómo es que las propiedades de absorbancia de los pigmentos fotosintéticos determinan la dirección en la que la energía se transfiere dentro de una unidad fotosintética?
2. ¿Cuál es la función de los pigmentos antena recolectores de luz en la fotosíntesis?
3. Describa la secuencia de fenómenos después de la absorción de un fotón en el pigmento del centro de reacción del fotosistema II. Describa los fenómenos comparables del fotosistema I. ¿Cómo se vinculan los dos fotosistemas?
4. Describa la diferencia en los potenciales redox de los pigmentos del centro de reacción de los dos fotosistemas.
5. Describa el proceso por el que el agua se divide durante la fotólisis. ¿Cuántos protones deben absorberse en el PSII para que esto ocurra?

6.5 FOTOFOSFORILACIÓN

Las reacciones dependientes de la luz descritas en las páginas anteriores proporcionan la energía necesaria para reducir el CO_2 en carbohidrato. En términos cuantitativos, la conversión de un mol de CO_2 en un mol de carbohidrato (CH_2O) requiere el ingreso de tres moles de ATP y dos moles de NADPH (véase fig. 6-19). Ya se explicó la forma en que las plantas producen el NADPH necesario para la fabricación de carbohidrato; ahora se examinará la manera en que estas mismas células producen el ATP necesario.

La maquinaria para la síntesis de ATP en un cloroplasto es idéntica a la de una mitocondria o una membrana plasmática de una bacteria anaeróbica. Como en esos casos, la sintetasa de ATP (fig. 6-16) consiste en una cabeza (CF_1 en los cloroplastos) la cual contiene el sitio catalítico de la enzima y una base (CF_0) que cruza la membrana y media el movimiento de protones. Las dos partes están conectadas por un tallo rotatorio. Las cabezas CF_1 se proyectan hacia fuera en el estroma, orientadas con el gradiente de protones, que tiene una mayor concentración dentro de la luz del tilacoide (fig. 6-16). Por tanto, los protones se mueven de una concentración más alta en la luz, a través de la base CF_0 de la sintetasa de ATP y hacia el estroma, lo que

impulsa la fosforilación de ADP como se describe en el capítulo 5 para la mitocondria.

Las mediciones que se efectúan durante los periodos de máxima síntesis de ATP sugieren que hay diferencias de 1 000 a 2 000 veces en las concentraciones de H^+ a través de las membranas tilacoides, correspondientes a un gradiente de pH (ΔpH) mayor de 3 unidades. Puesto que el movimiento de otros iones neutraliza el movimiento de los protones hacia la luz durante el transporte de electrones, no se acumula un potencial de membrana significativo. Por tanto, a diferencia de la mitocondria en la que la fuerza motriz de protones se expresa sobre todo como potencial electroquímico (pág. 198), la fuerza motriz de protones (Δp) que actúa en los cloroplastos se debe en su mayor parte o del todo al gradiente de pH.

Fotofosforilación no cíclica *vs.* cíclica

La formación de ATP durante el proceso de fotosíntesis oxigénica se denomina **fotofosforilación no cíclica** porque los electrones se mueven con trayectoria lineal (no cíclica) del H_2O al $NADP^+$ (fig. 6-16). Durante el decenio de 1950 Daniel Arnon de la *University of California* en Berkeley, descubrió que los cloroplastos aislados no sólo eran capaces de sintetizar ATP a partir de ADP, sino que podían hacerlo aun en ausencia de CO_2 o $NADP^+$ agregados. Estos experimentos indicaron que los cloroplastos tenían un medio para producir ATP que no requería la mayor parte de las reacciones fotosintéticas que habrían derivado en la producción de oxígeno, fijación de CO_2 o reducción del $NADP^+$. Todo lo necesario era iluminación, cloroplastos, ADP y P_i. El proceso que Arnon descubrió se llamó más tarde **fotofosforilación cíclica** y se ilustra en la figura 6-17. La fotofosforilación cíclica se realiza en el PSI de manera independiente del PSII. El proceso inicia con la absorción de un cuanto de luz en el PSI y la transferencia de un electrón de alta energía al receptor primario. A partir de ahí el electrón pasa a la ferredoxina, como siempre sucede, pero en lugar de transferirse al $NADP^+$, el electrón regresa al centro de reacción deficiente en electrones (como se muestra en la figura 6-17) para completar el ciclo. Durante el flujo de un electrón por este trayecto se libera suficiente energía para trasladar protones (se estima en dos H^+/e^-) a través de la membrana por acción del complejo citocromo b_6f y para establecer un gradiente de protones capaz de impulsar la síntesis de ATP. Se cree que la fotofosforilación cíclica proporciona el ATP adicional necesario tanto para la síntesis de carbohidratos (véase fig. 6-19) como para otras actividades en el cloroplasto que requieren ATP (p. ej., participación de las chaperonas moleculares en la importación de proteínas).

Ahora que se revisó cómo las reacciones lumínicas de la fotosíntesis conducen a la producción de ATP y NADPH, que son las reservas de energía necesarias para la síntesis de carbohidratos, puede regresarse a las reacciones que dan lugar a la formación de carbohidratos.

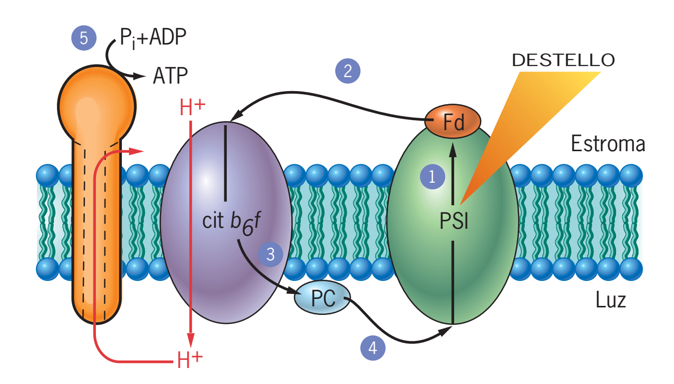


FIGURA 6-17 Esquema simplificado de la fotofosforilación cíclica. La absorción de luz excita un electrón, el cual se transfiere a la ferredoxina (paso 1) y al citocromo b_6f (paso 2), a la plastocianina (paso 3) y de regreso al $P700^+$ (paso 4). En el proceso los protones se trasladan en el citocromo b_6f para desarrollar un gradiente que se usa para sintetizar ATP (paso 5).

REVISIÓN

1. ¿Qué pasos de las reacciones dependientes de luz son los que se encargan de generar un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana tilacoide?
2. ¿A qué grado se refleja este gradiente en un gradiente de pH o de voltaje?
3. ¿Cómo es que el gradiente de protones conduce a la formación de ATP?

6.6 FIJACIÓN DEL DIÓXIDO DE CARBONO Y LA SÍNTESIS DE CARBOHIDRATOS

Después de la Segunda Guerra Mundial, Melvin Calvin de la *University of California* en Berkeley, junto con sus colegas Andrew Benson y James Bassham comenzaron lo que resultó un estudio de un decenio respecto a las reacciones enzimáticas mediante las que el dióxido de carbono se asimila en las moléculas orgánicas de la célula. Armados con el isótopo radiactivo duradero y recién disponible del carbono (^{14}C) y con una nueva técnica, la cromatografía bidimensional en papel, estos investigadores empezaron la tarea de identificar todas las moléculas marcadas que se producen cuando las células captan $[^{14}C]O_2$. Los estudios iniciaron con hojas de plantas, pero pronto cambiaron a un sistema más sencillo, el alga verde *Chlorella*. Las algas se cultivaron en cámaras cerradas en presencia de CO_2 sin marcar, tras lo cual se introdujo el CO_2 radiactivo mediante una inyección en el medio de cultivo. Después del periodo deseado de incubación con el CO_2 marcado, la suspensión de algas se drenó en un recipiente con alcohol caliente, que ejerce el efecto combinado de matar de inmediato las células, detener la actividad enzimática y extraer moléculas solubles. Luego se colocaron extractos de células como una mancha en papel cromatográfico y se sometieron a cromatografía bidimensional. Para localizar los compuestos radiactivos al final del procedimiento, se presionó una película para rayos X contra el cromatograma y las

placas se mantuvieron en la oscuridad para exponer la película. Después del revelado fotográfico se identificaron compuestos con la marca radiactiva en la autorradiografía mediante la comparación con estándares conocidos y el análisis químico de las manchas originales. A continuación se describen algunos de sus hallazgos.

Síntesis de carbohidrato en las plantas C_3

El CO_2 marcado se convirtió en compuestos orgánicos reducidos con gran rapidez. Si el periodo de incubación era muy corto (hasta unos cuantos segundos), predominaba una mancha radiactiva en el cromatograma (fig. 6-18). Se estableció que el compuesto que formaba la mancha era 3-fosfoglicerato (PGA), uno de los intermediarios de la glucólisis. Al principio el grupo de Calvin sospechó que el CO_2 se unía con enlaces covalentes (o se *fijaba*) a un compuesto de dos carbonos para formar la molécula de tres carbonos de PGA. Como el primer intermediario en identificarse fue una molécula de tres carbonos, las plantas que utilizan esta vía para fijar el CO_2 atmosférico se denominaron **plantas C_3**.

Luego de una larga investigación se evidenció que el receptor inicial no era un compuesto de dos carbonos, sino un compuesto de cinco carbonos, el 1,5-difosfato de ribulosa (RuBP), que se condensa con CO_2 para producir una molécula de seis carbonos. Este compuesto de seis carbonos se fragmentó poco después en dos moléculas de PGA, una de las cuales contenía el átomo de carbono recién agregado. Tanto la condensación del difosfato de ribulosa como la separación del producto de seis carbonos (fig. 6-19*a*) se llevan a cabo en el estroma por medio de una gran enzima con múltiples subunidades, la *carboxilasa de difosfato de ribulosa*, que recibe el nombre familiar de *Rubisco*. Como la enzima encargada de convertir el carbono inorgánico en moléculas biológicas útiles, Rubisco es una de las proteínas clave en la biosfera. Tal como sucede, Rubisco es capaz de fijar sólo tres moléculas de CO_2 por segundo, lo que debe ser el peor número de recambio de cualquier enzima conocida (véase cuadro 3-3). Casi la mitad de la proteína de las hojas está representada por Rubisco para compensar su ineficiencia. De hecho esta enzima constituye la proteína más abundante en la Tierra: existen unos 5 a 10 kg por cada ser humano.

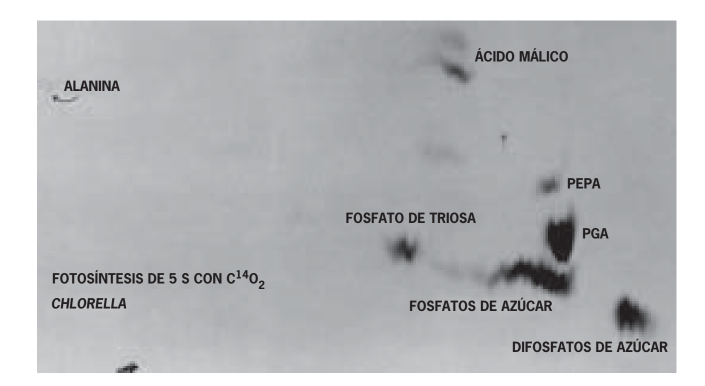


FIGURA 6-18 Cromatografía que muestra los resultados de un experimento en el que células de algas se incubaron durante 5 s en $[^{14}C]O_2$ antes de la inmersión en alcohol. Una mancha, que corresponde a 3-fosfoglicerato (marcada PGA), contiene la mayor parte de la radiactividad. (Cortesía de James Bassham y Melvin Calvin.)

La identificación de la estructura de varios intermediarios, junto con las posiciones de los átomos de carbono marcados, hizo aparente que la vía para la conversión de CO_2 en carbohidrato era cíclica y compleja. Esta vía se denominó **ciclo de Calvin** (o **ciclo de Calvin-Benson**) y está presente en cianobacterias y en todas las células fotosintéticas eucariotas. La figura 6-19*b* muestra una versión simplificada del ciclo de Calvin. El ciclo consta de tres partes principales: a) carboxilación de difosfato de ribulosa para formar PGA; b) reducción de PGA al nivel de un azúcar (CH_2O) mediante la formación de gliceraldehído-3-fosfato (GAP) con el NADPH y el ATP que se producen en las reacciones dependientes de la luz, y c) regeneración de difosfato de ribulosa, que también requiere ATP. En la figura 6-19B se muestra que por cada seis moléculas de CO_2 fijadas, se producen 12 moléculas de gliceraldehído-3-fosfato. (El GAP es la mancha marcada como fosfato de triosa en la cromatografía de la fig. 6-18.) Los átomos en 10 de estas moléculas de GAP de tres carbonos cambian de disposición para regenerar seis moléculas del receptor de CO_2 de cinco carbonos, el difosfato de ribulosa (figura 6-19*b*). Las otras dos moléculas de GAP pueden considerarse productos. Estas moléculas de GAP pueden exportarse al citosol a cambio de iones fosfato (véase fig. 6-20) y usarse en la síntesis del disacárido sacarosa. Una alternativa consiste en que el GAP permanezca en el cloroplasto, donde se convierte en almidón. La figura 6-20 presenta una revisión del proceso completo de la fotosíntesis, inclusive las reacciones lumínicas (absorción de luz, oxidación del agua, reducción de $NADP^+$, translocación de protones), la fosforilación de ADP, el ciclo de Calvin y la síntesis de almidón o sacarosa.

Las moléculas de sacarosa que se forman en el citosol a partir del gliceraldehído-3-fosfato del ciclo de Calvin se transportan fuera de las células de las hojas y al floema, donde se trasladan a los diversos órganos no fotosintéticos de la planta. Del mismo modo que la glucosa sirve como fuente de energía y bloques orgánicos de construcción en la mayor parte de los animales, la sacarosa tiene una función análoga en casi todas las plantas. Por otro lado, el almidón se almacena dentro de los cloroplastos como gránulos (véase fig. 2-17*b*). Tal como el glucógeno almacenado proporciona a los animales glucosa disponible en momentos de necesidad, el almidón almacenado en las hojas de las plantas les brinda azúcares por la noche, cuando las reacciones dependientes de la luz no son posibles. Con base en las reacciones de la figura 6-19*b* resulta evidente que la síntesis de carbohidratos es una actividad costosa. La conversión de seis moléculas de CO_2 en una molécula de azúcar de seis carbonos y la regeneración de difosfato de ribulosa requieren 12 moléculas de NADPH y 18 moléculas de ATP. Este gran gasto de energía refleja el hecho de que el CO_2 es la forma más oxidada en la que el carbono puede encontrarse.

Control redox A lo largo del libro se describen varios conjuntos de mecanismos que las células emplean para controlar la actividad de las proteínas. Uno de éstos, conocido como *control redox*, aparece cada vez con mayor frecuencia como un regulador de los procesos celulares básicos, entre ellos el plegamiento de las proteínas, la transcripción y la traducción. Se considera en esta sección porque se comprende mejor como regulador del

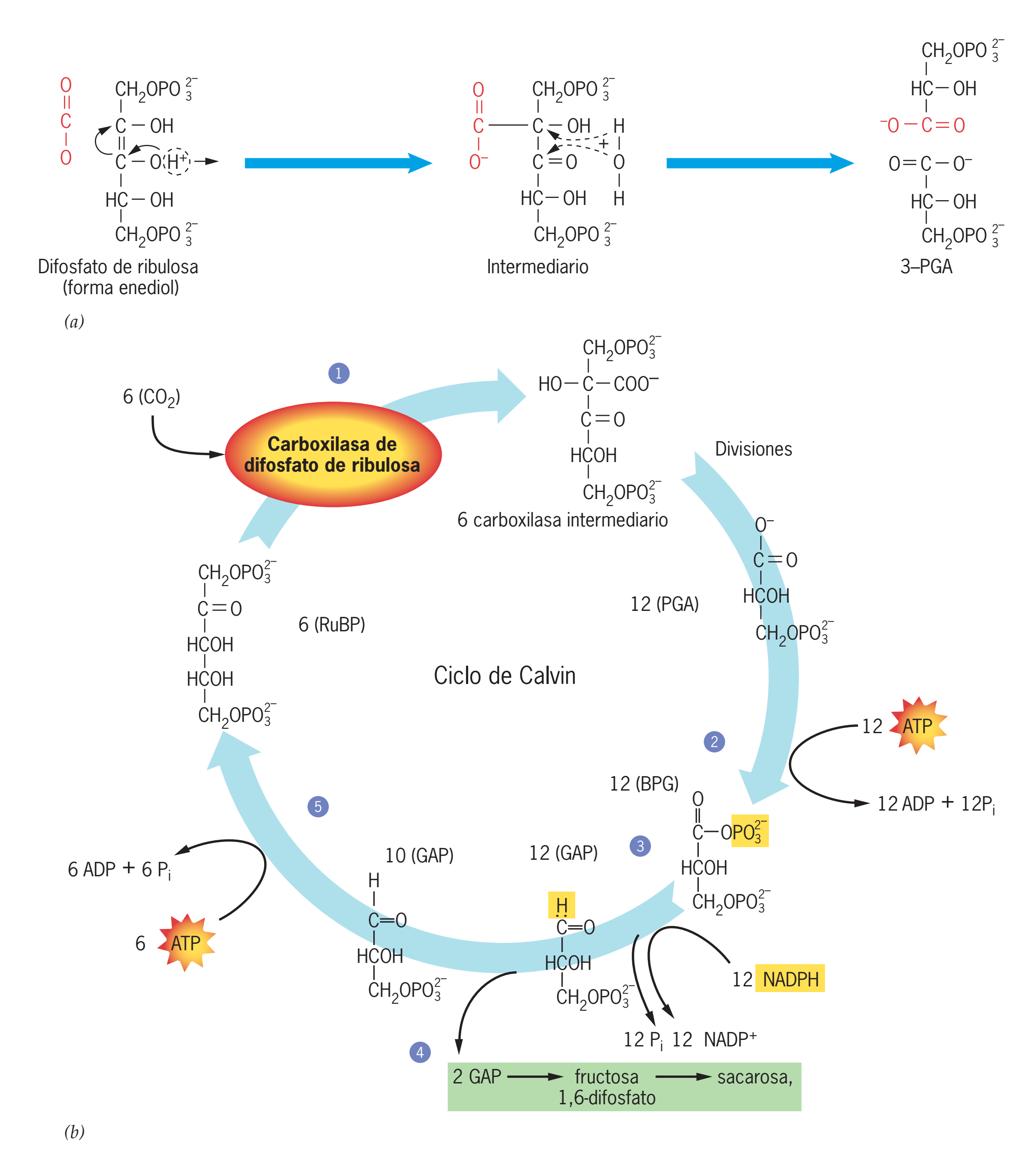


FIGURA 6-19 Conversión de CO_2 en carbohidrato. *a*) Reacción catalizada por la carboxilasa de difosfato de ribulosa (Rubisco) en la que se fija el CO_2 mediante enlace con el difosfato de ribulosa. El producto se separa rápidamente en dos moléculas de 3-fosfoglicerato. *b*) Versión abreviada del ciclo de Calvin que muestra el destino de seis moléculas de CO_2 que se fijan por combinación con seis moléculas de difosfato de ribulosa. (Se omitieron muchas reacciones.) La fijación de CO_2 se indica en el paso 1. En el paso 2, las 12 moléculas de PGA se fosforilaron para formar 12 moléculas de 1,3-difosfoglicerato (DPG), que se reducen en el paso 3 con los electrones que NADPH proporciona para formar 12 moléculas de gliceraldehído 3-fosfato (GAP). En este punto, dos de las moléculas de GAP salen (paso 4) para emplearse en la síntesis de sacarosa en el citosol, que puede considerarse el producto de las reacciones independientes de la luz. Las otras 10 moléculas se convierten en seis moléculas de difosfato de ribulosa (paso 5), que actúan como receptor para seis moléculas más de CO_2. La regeneración de seis moléculas de difosfato de ribulosa requiere la hidrólisis de seis moléculas de ATP. El NADPH y el ATP que se utilizan en el ciclo de Calvin representan los dos productos de alta energía de las reacciones dependientes de la luz.

metabolismo del cloroplasto. Varias enzimas clave del ciclo de Calvin sólo están activas con la luz, cuando se producen ATP y NADPH por fotosíntesis. Este control dependiente de la luz de las enzimas del cloroplasto lo ejerce una pequeña proteína llamada tiorredoxina que puede encontrarse en su forma reducida u oxidada. Como se menciona en la página 227, no todos los electrones que pasan por la ferredoxina se emplean para reducir $NADP^+$. De hecho, algunos de estos electrones se trasladan a

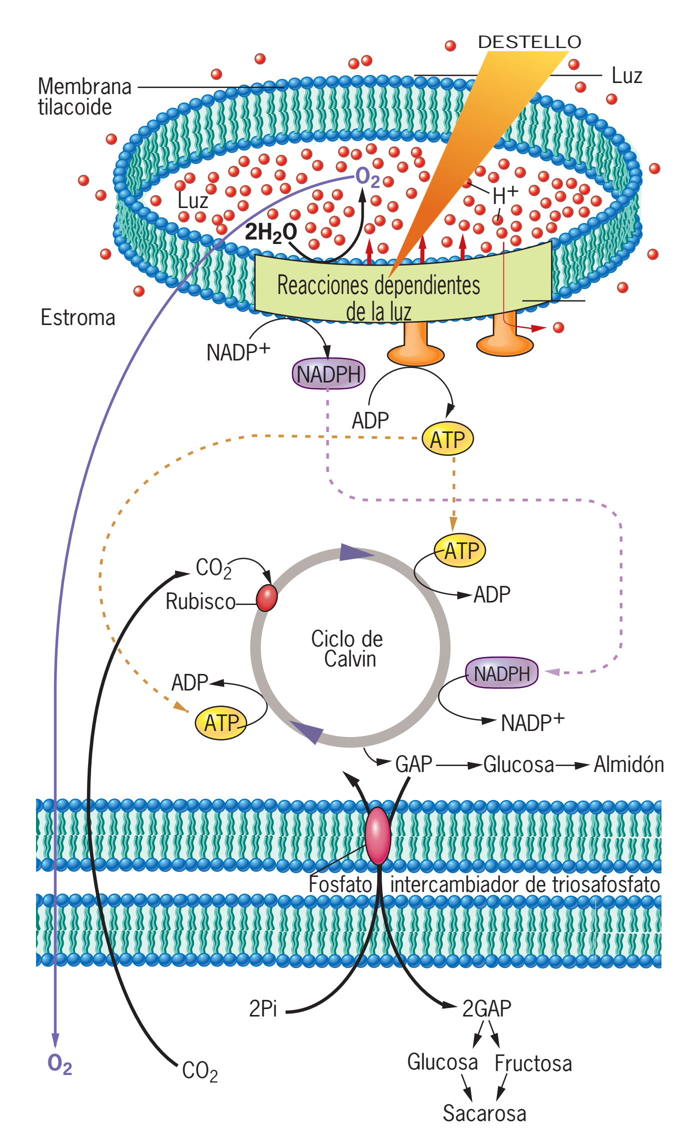


FIGURA 6-20 **Una revisión de las diversas etapas de la fotosíntesis.**

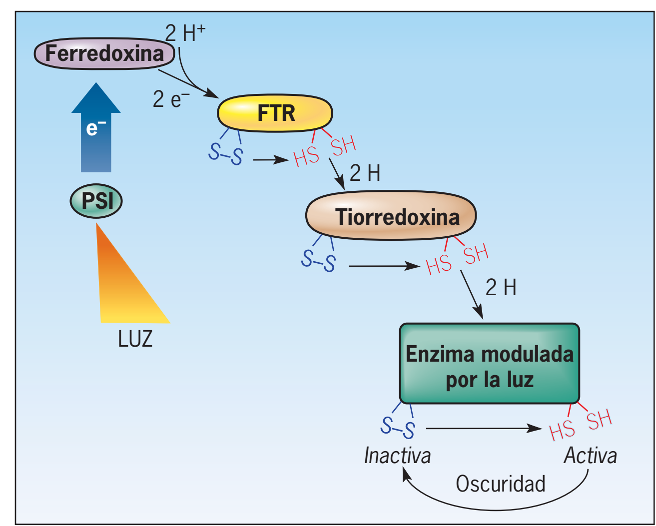


FIGURA 6-21 **Control redox del ciclo de Calvin.** En la luz, la ferredoxina se reduce y una fracción de estos electrones se transfiere a la pequeña proteína tiorredoxina, que reduce los grupos disulfuro de ciertas enzimas del ciclo de Calvin y las mantiene en estado activo. En la oscuridad, el flujo de electrones hacia la tiorredoxina cesa, los grupos sulfhidrilo de las enzimas reguladas cambian al estado disulfuro y las enzimas se desactivan.

la tiorredoxina. Una vez que aceptó un par de electrones, la tiorredoxina reduce ciertos puentes disulfuro (—S-S—) en grupos sulfhidrilo (—SH) en algunas enzimas del ciclo de Calvin (fig. 6-21). Este cambio covalente en la estructura proteica activa estas enzimas y ello fomenta la síntesis de carbohidratos en el cloroplasto. En la oscuridad, cuando la fotosíntesis cesa, la tiorredoxina ya no se reduce por efecto de la ferredoxina y las enzimas del ciclo de Calvin se revierten al estado oxidado (—S-S—) en el que están inactivas. De estos hallazgos se deduce que la referencia a las reacciones del ciclo de Calvin como "reacciones de oscuridad" es un error grave.

Fotorrespiración Una de las manchas que aparecieron en las cromatografías del trabajo inicial de Calvin con las células de algas se identificó como el compuesto glicolato, que se ignoró (de manera acertada) en la formulación del ciclo de Calvin de la figura 6-19. Aunque el glicolato no es parte del ciclo de Calvin, es producto de una reacción catalizada por Rubisco. Unos 20 años después que se descubrió que Rubisco cataliza la unión de CO_2 con difosfato de ribulosa, se encontró que esta enzima también cataliza una segunda reacción en la que el O_2 se une con el difosfato de ribulosa para producir 2-fosfoglicolato (junto con PGA) (fig. 6-22). Una enzima convierte después el fosfoglicolato en glicolato en el estroma. El glicolato que se produce en el cloroplasto se transfiere al peroxisoma y al final permite la liberación de CO_2 como se describe más adelante (véase fig. 6-23).

Debido a la captación de O_2 y la liberación de CO_2, tal reacción se denomina **fotorrespiración**. Dado que la fotorrespiración conduce a la liberación de las moléculas de CO_2 fijadas con anterioridad, es un desperdicio de la energía de la planta. De hecho la fotorrespiración ocasiona la pérdida de hasta 50% del dióxido de carbono recién fijado en los sembradíos que crecen en condiciones de luz de alta intensidad. Por tanto, como era de esperarse, desde hace decenios se mantiene un esfuerzo concertado para cultivar plantas con menor probabilidad de experimentar fotorrespiración. Los esfuerzos no han tenido éxito hasta ahora.

Los estudios de la actividad enzimática de la Rubisco purificada muestran que la enzima tiene una preferencia hasta cierto punto baja por el CO_2 como sustrato con respecto al O_2. La razón de esta falta de especificidad es que ni el CO_2 ni el O_2 se unen con el sitio activo de la enzima (véase fig. 3-11*a*). La enzima se une con el difosfato de ribulosa, que adopta la forma de enediol mostrada en la figura 6-22. Esta forma de difosfato de ribulosa puede entonces ser atacada por el CO_2 o el O_2. Vista de esta manera, la fotorrespiración parece consecuencia inevita-

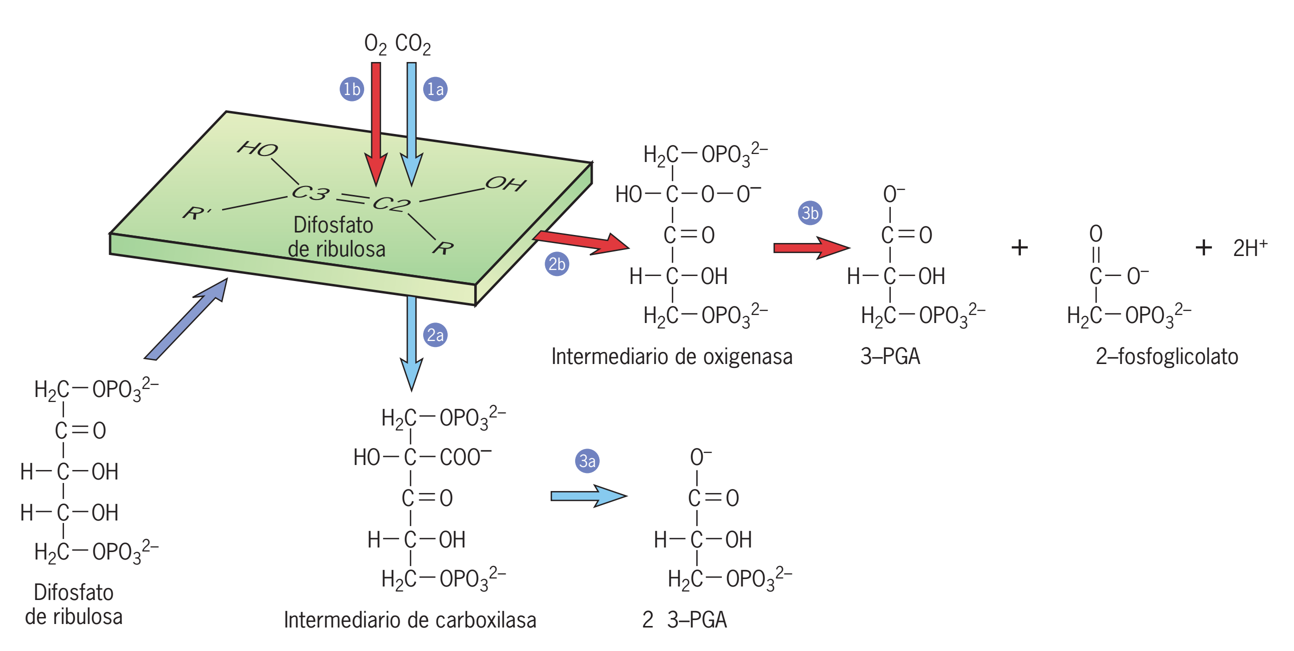


FIGURA 6-22 Reacciones de la fotorrespiración. La enzima Rubisco puede catalizar dos reacciones diferentes con el difosfato de ribulosa como sustrato (mostrado en estado enediol dentro del plano, véase figura 6-19*a*). Si el difosfato de ribulosa reacciona con O_2 (paso 1b), la reacción produce un intermediario de oxigenasa (paso 2b) que se degrada en 3-PGA y 2-fosfoglicolato (paso 3b). Las reacciones subsecuentes del fosfoglicolato se muestran en la figura 6-23. El resultado final de estas reacciones es la liberación de CO_2, una molécula en la que la célula había gastado energía antes para fijarla. En contraste, si el difosfato de ribulosa reacciona con CO_2 (paso 1a), la reacción produce un intermediario de carboxilasa (paso 2a) que se degrada en dos moléculas de PGA (paso 3a), que continúa por el ciclo de Calvin.

ble de las propiedades catalíticas de Rubisco, una enzima que se supone evolucionó en una época en la que los niveles de O_2 en la atmósfera eran casi inexistentes. Bajo las condiciones atmosféricas actuales el O_2 y el CO_2 compiten entre sí y la dirección predominante de la reacción catalizada por Rubisco depende de la proporción CO_2/O_2 disponible para la enzima. Cuando las plantas crecen en ambientes cerrados que contienen niveles elevados de CO_2, son capaces de mantener un crecimiento mucho más rápido gracias a sus altos índices de fijación de CO_2. Se sugiere que la elevación de los niveles atmosféricos de CO_2 en el último siglo (desde cerca de 270 partes por millón en 1870 a 380 ppm en la actualidad) es la causa del incremento de hasta 10% en la producción agrícola durante este periodo. También se cree que este incremento en la concentración atmosférica de CO_2 es el causante del calentamiento global, o sea, el aumento general en las temperaturas promedio en el planeta. Aun un pequeño aumento en la temperatura podría tener efectos mayores en las condiciones mundiales, como la elevación del nivel de los océanos y la extensión de los desiertos del planeta.

Peroxisomas y fotorrespiración Los peroxisomas son organelos citoplásmicos cuya función en el metabolismo oxidativo se explicó en la sección 5.6 del capítulo anterior. Los estudios referentes a los peroxisomas de las células de las hojas revelaron un ejemplo sorprendente de interdependencia entre los diferentes organelos. La micrografía electrónica de la figura 6-23 muestra un peroxisoma de una célula de hoja situada contra las superficies de dos cloroplastos adyacentes y muy próxima a una mitocondria cercana. Esta disposición no es una coincidencia, sino que refleja una relación bioquímica subyacente en la que los productos de un organelo sirven como sustrato en otro. Las reacciones que ocurren en los diferentes organelos se superponen en la micrografía de la figura 6-23 y se resumen a continuación.

Como se indicó, la fotorrespiración comienza cuando el difosfato de ribulosa reacciona con O_2 para formar 3-PGA y un compuesto de dos carbonos, el fosfoglicolato (fig. 6-22). Tras su formación, el fosfoglicolato se convierte en glicolato, que se traslada del cloroplasto al peroxisoma. Ya en el peroxisoma, la enzima oxidasa de glicolato convierte el glicolato en glioxilato, que posteriormente puede transformarse en glicina y trasladarse a una mitocondria. En la mitocondria, dos moléculas de glicina (una molécula de dos carbonos) se convierten en una molécula de serina (una molécula de tres carbonos), con la liberación concomitante de una molécula de CO_2. En consecuencia, por cada dos moléculas de fosfoglicolato producidas por Rubisco, un átomo de carbono que antes estaba fijo se pierde a la atmósfera. La serina que se produce en la mitocondria puede enviarse de regreso al peroxisoma y transformarse en glicerato, que puede transportarse al cloroplasto y usarse en la síntesis de carbohidrato mediante la formación de 3-PGA.

Dos grupos de plantas, llamadas plantas C_4 y CAM, superaron los efectos negativos de la fotorrespiración al desarrollar mecanismos metabólicos que incrementan la proporción CO_2/O_2 al que las moléculas de la enzima Rubisco se exponen.

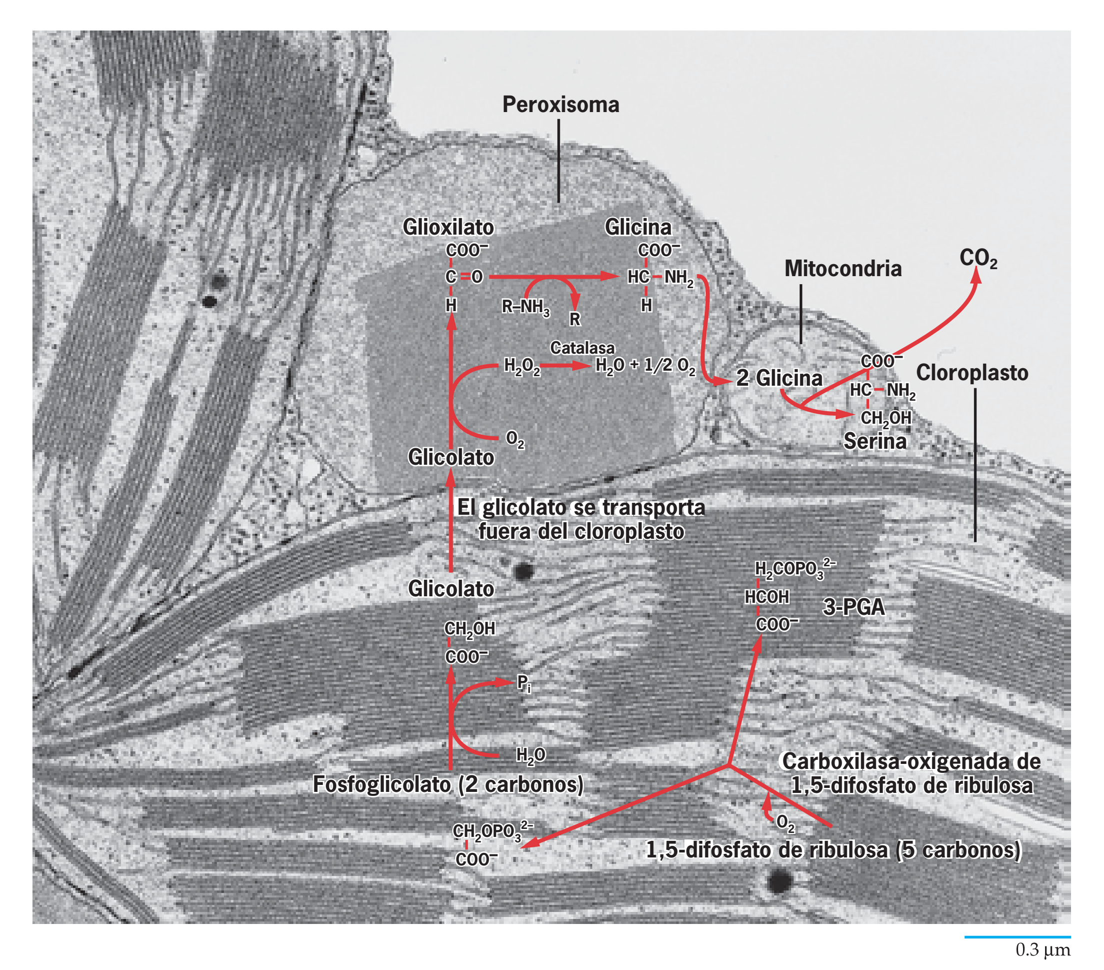


FIGURA 6-23 Base celular de la fotorrespiración. Micrografía electrónica de una porción de una célula mesófila de una hoja de tabaco que muestra un peroxisoma (identificado por su centro cristalino) presionado contra un par de cloroplastos y cerca de una mitocondria. Las reacciones de la fotorrespiración que ocurren en cada uno de estos organelos se describen en el texto y se muestran sobrepuestas sobre los organelos en los que tienen lugar. Esta serie de reacciones se conoce como Ciclo C_2. Los últimos pasos del ciclo, la conversión de serina en glicerato en el peroxisoma y luego en 3-PGA en el cloroplasto, no se muestran. (MICROGRAFÍA CORTESÍA DE SUE ELLEN FREDERICK Y ELDON H. NEWCOMB.)

Síntesis de carbohidratos en las plantas C_4

Hugo Kortschak publicó en 1965 que cuando a la caña de azúcar se le suministra $[^{14}C]O_2$, la radiactividad aparece primero en los compuestos orgánicos que contienen esqueletos de cuatro carbonos en lugar de la molécula PGA de tres carbonos que se encuentra en otros tipos de plantas. Un análisis más minucioso reveló que estos compuestos de cuatro carbonos (sobre todo el oxaloacetato y el malato) provenían de la combinación de CO_2 con fosfoenolpiruvato (PEP), por lo que representan un segundo mecanismo de fijación del dióxido de carbono atmosférico (fig. 6-24). La enzima que se encarga de unir el CO_2 con el PEP se denominó *carboxilasa de fosfoenolpiruvato* y cataliza el primer paso de la **vía C_4**. Las plantas que utilizan esta vía se conocen como **plantas C_4** y su principal representante son los pastos tropicales. Antes de considerar el destino de este átomo de carbono recién fijado es conveniente examinar las posibles razones por las que se desarrolló una vía alternativa para la fijación del dióxido de carbono.

Cuando una planta C_3 se coloca en una cámara cerrada y se vigila su vía fotosintética, se observa que una vez que la planta reduce los niveles de CO_2 en la cámara a cerca de 50 partes por millón (ppm), la velocidad de liberación de CO_2 por fotorrespiración es igual al ritmo de fijación de CO_2 por fotosíntesis, por lo que la producción neta de carbohidrato cesa. En contraste, una planta que emplea la vía C_4 continúa la síntesis neta de carbohidrato hasta que los niveles de CO_2 descienden a 1 a 2 ppm. Las plantas C_4 poseen esta capacidad porque la carboxilasa de PEP mantiene su operación con niveles de CO_2 mucho menores que los de la enzima Rubisco y no se inhibe con el O_2. Pero, ¿cuál es el valor de una planta que puede fijar CO_2 a niveles tan bajos cuando la atmósfera tiene siempre niveles de CO_2 mayores de 300 ppm?

El valor de la vía C_4 se evidencia cuando las plantas C_4 se colocan en un ambiente seco y caliente similar al sitio donde muchas de ellas se desarrollan. El problema más grave que las plantas que viven en un clima cálido y seco enfrentan es la pérdida de agua por las aberturas, llamadas estomas, en las superficies de sus hojas (fig. 6-2). Aunque los estomas abiertos permiten la pérdida de agua, también brindan un canal por el que el CO_2 entra a las hojas. Las plantas C_4 están adaptadas a ambientes cálidos y áridos porque son capaces de cerrar sus estomas para

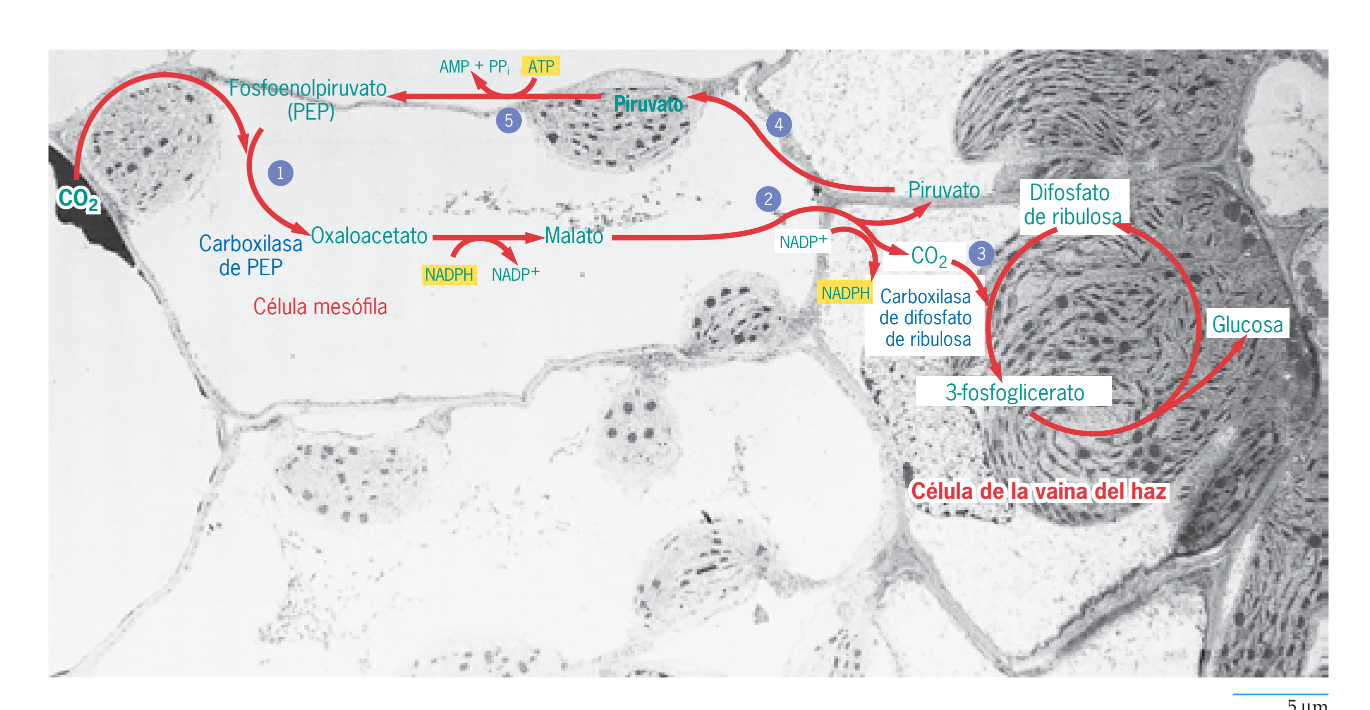


FIGURA 6-24 Estructura y función en las plantas C_4. Micrografía electrónica de un corte transversal de una hoja de planta C_4 que muestra la relación espacial entre las células mesófilas y las de la vaina del haz. Sobre la micrografía se superpusieron las reacciones de la fijación de CO_2 que ocurren en cada tipo de célula. En el paso 1, el CO_2 se une con el fosfoenolpiruvato mediante la enzima carboxilasa de PEP en una célula mesófila que se localiza cerca del exterior de la hoja. El malato de cuatro carbonos que se forma por esta reacción se traslada a una célula de la vaina del haz que se localiza en un punto más central (paso 2), donde el CO_2 se libera. El CO_2 se concentra en la célula de la vaina del haz, lo que favorece la fijación de CO_2 por Rubisco para formar 3-PGA (paso 3), el cual circula por el ciclo de Calvin. El piruvato que se forma cuando el CO_2 se libera se regresa a la célula mesófila (paso 4), donde se convierte en fosfoenolpiruvato. Aunque el proceso requiere la hidrólisis de ATP (paso 5), el alto índice CO_2/O_2 en la célula de la vaina del haz minimiza la velocidad de la fotorrespiración. (MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA CORTESÍA DE S. CRAIG.)

prevenir la pérdida de agua, pero pueden mantener la captación suficiente de CO_2 para alimentar su actividad fotosintética hasta su ritmo máximo. Esta es la razón por la que el garranchuelo, una planta C_4, tiende a rebasar el césped y desplaza los pastos C_3 domésticos que se plantaron originalmente. La caña de azúcar, el maíz y el sorgo son los cultivos más importantes que usan la vía C_4. Como la mayor parte de las plantas C_4 no se desarrolla tan bien en temperaturas más frías, su distribución se limita a mayores latitudes septentrionales y meridionales.

Cuando se sigue el destino del CO_2 fijado mediante la vía C_4, se observa que el grupo CO_2 se libera pronto, sólo para que Rubisco lo capture de nuevo y lo convierta en los intermediarios metabólicos de la vía C_3 (fig. 6-24). La base para este metabolismo en apariencia paradójico se vuelve evidente al examinar la anatomía de la hoja de una planta C_4. A diferencia de las hojas de las plantas C_3, las hojas de C_4 contienen dos cilindros concéntricos de células: un cilindro exterior formado por *células mesófilas* y un cilindro interior compuesto por *células de la vaina del haz* (fig. 6-24). La fijación de CO_2 al fosfoenolpiruvato ocurre en las células mesófilas externas. La actividad de la carboxilasa de PEP puede continuar aun cuando los estomas de las hojas estén casi cerrados y el nivel de CO_2 en las células sea muy bajo. Tras su formación, los productos C_4 se transportan a través de los plasmodesmas en la pared celular adyacente (véase fig. 7-35) y hacia las células de la vaina del haz de paredes gruesas, que están selladas a los gases atmosféricos. Una vez en las células de la vaina del haz, el CO_2 fijado con anterioridad puede separarse del portador C_4, lo que produce un nivel elevado de CO_2 en estas células interiores, un nivel adecuado para la fijación de Rubisco. Los valores de dióxido de carbono en las células de la vaina del haz pueden ser 100 veces más altos que en las células mesófilas. Por tanto la vía C_4 proporciona un mecanismo para impulsar la fijación de CO_2 por la vía C_3 menos eficiente mediante el "bombeo" de CO_2 hacia la vaina del haz. Tras la separación de CO_2 del compuesto de cuatro carbonos, el piruvato formado regresa a las células mesófilas para recargarse como fosfoenolpiruvato (fig. 6-24). Además de ahorrar agua, las plantas que utilizan la vía C_4 son capaces de generar altos índices de CO_2/O_2 en el ambiente local de Rubisco, lo que favorece el proceso de fijación del CO_2 sobre la fotorrespiración. De hecho los intentos para demostrar la fotorrespiración en las hojas intactas de plantas C_4 casi siempre fracasan.

Antes de dejar el tema de la fotosíntesis C_4, cabe señalar que varios laboratorios botánicos pretenden introducir partes de la maquinaria fotosintética C_4 en las plantas C_3 como un intento para impulsar la productividad agrícola. Por ejemplo, el gen de la carboxilasa del PEP del maíz (una planta C_4) se introdujo en el arroz (una planta C_3) con la esperanza de crear un mecanismo concentrador de CO_2 dentro de las células mesófilas del arroz donde se encuentra la enzima Rubisco. Aunque algunos estudios de campo de estas plantas modificadas por ingeniería genética son alentadores, aún es demasiado pronto para afirmar si alguno de los aumentos observados en la eficiencia fotosintética se debe a los niveles más altos de asimilación de CO_2, a

los menores niveles de fotorrespiración, a la mayor resistencia al estrés o a algún otro mecanismo.

Síntesis de carbohidratos en las plantas CAM

Muchas plantas desérticas, como los cactos, tienen otra adaptación bioquímica que les permite sobrevivir en un hábitat muy caliente y seco. Se conocen como **plantas CAM** y utilizan la carboxilasa del PEP en la fijación del CO_2 atmosférico, como las plantas C_4.[3] Sin embargo, a diferencia de estas últimas, las especies CAM efectúan reacciones dependientes de la luz y fijación de CO_2 en momentos diferentes del día, en lugar de hacerlo en distintas células de la hoja. En tanto las plantas C_3 y C_4 abren los estomas de sus hojas y fijan el CO_2 en el día, las plantas CAM mantienen sus estomas cerrados durante las horas calientes y secas del día. Luego, por la noche, cuando la velocidad de pérdida de vapor de agua disminuye mucho, abren sus estomas y fijan el CO_2 mediante la carboxilasa de PEP. Como cada vez más dióxido de carbono se fija en las células mesófilas durante la noche, el malato que se genera se traslada hacia la vacuola central de la célula. La presencia de malato (en forma de ácido málico dentro de la vacuola ácida) es evidente por el "estado matutino" ácido de las plantas. Durante el día los estomas se cierran y el ácido málico se mueve hacia el citoplasma. Ahí libera el CO_2 que la enzima Rubisco puede fijar en presencia de las concentraciones bajas de CO_2 que existen cuando los estomas están cerrados. Luego los carbohidratos se sintetizan con la energía del ATP y el NADPH generados por las reacciones dependientes de la luz.

[3] CAM es un acrónimo para *metabolismo ácido de crassulaceas,* denominado así por las plantas de la familia Crassulaceae en las que se descubrió.

REVISIÓN ?

1. Describa el plan básico del ciclo de Calvin, indicando las reacciones que requieren ingreso de energía. ¿Por qué se define como un ciclo? ¿Por qué debe gastarse energía en este tipo de vía? ¿Cuáles son los productos finales de la vía?
2. Describa las principales diferencias estructurales y bioquímicas entre las plantas C_3 y las C_4. ¿Cómo influyen estas diferencias en la capacidad de estos dos tipos de plantas para crecer en climas cálidos y secos?

SINOPSIS

Se supone que las primeras formas de vida eran heterótrofos que dependían de moléculas orgánicas formadas en condiciones abióticas; al final, estas formas fueron rebasadas por los autótrofos, organismos capaces de sobrevivir con el CO_2 como su principal fuente de carbono. Se cree que los primeros autótrofos realizaron fotosíntesis no oxigénica en la que compuestos como el H_2S se oxidaban como fuente de electrones. La evolución de la fotosíntesis oxigénica, en la que el agua se oxida y se libera O_2, permitió a las cianobacterias explotar una variedad de hábitat mucho más amplia y establecer la base para la respiración aeróbica (pág. 214).

Los cloroplastos son organelos grandes limitados por membrana que evolucionaron de un procariota fotosintético. Los cloroplastos están limitados por una doble membrana porosa por la inclusión de porinas en la membrana externa. Los tilacoides son sacos membranosos aplanados dispuestos en pilas ordenadas o granos. Los tilacoides están rodeados por un estroma fluido que contiene DNA, ribosomas y la maquinaria necesaria para la expresión genética (pág. 216).

Las reacciones de la fotosíntesis dependientes de la luz comienzan con la absorción de fotones por parte de los pigmentos fotosintéticos, un fenómeno que impulsa los electrones a los orbitales exteriores, desde los cuales pueden transferirse a un receptor de electrones. Los principales pigmentos absorbentes de luz en las plantas son las clorofilas y los carotenoides. Cada molécula de clorofila consiste en un anillo de porfirina que contiene Mg^{2+} que participa en la absorción de la luz y una cola de hidrocarburo (un fitol) que mantiene el pigmento incrustado en la bicapa. La clorofila absorbe con más avidez las regiones azul y roja del espectro visible y con menor fuerza el verde. Los carotenoides absorben con mayor avidez las regiones azul y verde, y con menor las regiones roja y naranja. El espectro de acción de la fotosíntesis, que muestra las longitudes de onda que pueden estimular la fotosíntesis, sigue muy de cerca al espectro de absorción de los pigmentos. Los pigmentos fotosintéticos se organizan en unidades funcionales en las que una sola molécula, la clorofila del centro de reacción, transfiere electrones a un receptor de electrones. Casi todas las moléculas de pigmento forman una antena recolectora de luz que atrapa fotones de diferentes longitudes de onda y transfiere la energía de excitación a la molécula de pigmento en el centro de reacción (pág. 219).

La transferencia de un par de electrones de H_2O a $NADP^+$ bajo condiciones propias de los cloroplastos utiliza el ingreso de casi 2 V de energía, que se obtiene de la acción combinada de dos fotosistemas separados. El fotosistema II (PSII) impulsa electrones de un nivel energético menor al del agua hasta el punto intermedio, mientras que el fotosistema I (PSI) lleva los electrones al mayor nivel energético, por arriba de $NADP^+$. Conforme cada uno de los fotosistemas absorbe fotones, la energía pasa a sus pigmentos del centro de reacción respectivos (P680 para PSII y P700 para PSI). La energía absorbida por las clorofilas del centro de reacción sirve para impulsar los electrones a un orbital exterior, de donde se transfieren a un receptor primario y se produce un pigmento con carga positiva ($P680^+$ y $P700^+$) (pág. 222).

El trayecto del flujo no cíclico de electrones del agua al PSII y luego del PSI a $NADP^+$ tiene la forma de una Z. La primera rama de esta Z va del H_2O al PSII. La mayor parte de los pigmentos antena que recolectan luz para el PSII se encuentra en un complejo separado que se denomina LHCII. La energía fluye del LHCII al centro de reacción del PSII, donde un electrón de P680 se transfiere a un receptor primario, que es una molécula de feofitina similar a la clorofila. Esta transferencia de electrones genera un agente oxidante fuerte ($P680^+$) y un agente reductor débil (Feo^-). La separación de la carga en el PSII se estabiliza mediante el movimiento de las moléculas con carga contraria para que queden más alejadas; esto se logra cuando el electrón se transfiere de la feofitina a la quinina PQ_A y luego a la PQ_B. La absorción sucesiva de

dos fotones por el PSII conduce a la transferencia de dos electrones a PQ_B para formar PQ_B^{2-}, que después capta dos protones del estroma, y se forma PQH_2 (plastoquinona reducida). La plastoquinona reducida sale del centro de reacción y se sustituye por una plastoquinona oxidada que es capaz de recibir electrones adicionales. Conforme cada electrón se traslada de P680 al receptor primario y luego a PQ_B, el pigmento del centro de reacción con carga positiva ($P680^+$) se neutraliza por un electrón proveniente de una proteína que contiene cuatro iones manganeso y un ion calcio. Conforme cada electrón se traslada a P680, la proteína que contiene Mn-Ca acumula un equivalente oxidante. Una vez que la proteína acumuló cuatro equivalentes oxidantes puede retirar cuatro electrones del agua, una reacción que genera O_2 y libera cuatro H^+ a la luz tilacoide, lo que contribuye al gradiente de protones (pág. 223).

Los electrones de la plastoquinona reducida se transfieren al complejo proteico múltiple citocromo b_6f, mientras que los protones se liberan a la luz tilacoide, lo que contribuye al gradiente de protones. Los electrones del citocromo b_6f pasan a la plastocianina, localizada en el lado luminal de la membrana tilacoide, y a $P700^+$, el pigmento del centro de reacción del PSI que perdió un electrón luego de absorber un fotón. Conforme P700 absorbe cada fotón, el electrón se transfiere a un receptor primario, A_0, y luego a través de varios centros de hierro-azufre del centro de reacción del PSI hasta la ferredoxina. Los electrones se trasladan de la ferredoxina a $NADP^+$ y se forma NADPH, que requiere un protón del estroma, y esto contribuye al gradiente de protones. En resumen, el flujo no cíclico de electrones produce la oxidación de H_2O en O_2, con la transferencia de electrones a $NADP^+$, la formación de NADPH y el establecimiento de un gradiente de H^+ a través de la membrana (pág. 226).

El gradiente de protones que se establece durante las reacciones dependientes de la luz proporciona la energía necesaria para la formación de ATP en el cloroplasto, un proceso que se denomina fotofosforilación. La maquinaria para la síntesis de ATP en el cloroplasto es idéntica a la de la mitocondria; la sintetasa de ATP consiste en una cabeza CF_1 que sobresale del estroma y una base CF_0 que está incrustada en la membrana tilacoide. Los protones impulsan la formación de ATP cuando se mueven de una mayor concentración en la luz del tilacoide, a través de la base CF_0 y hasta el estroma, lo que disipa el gradiente de H^+. La síntesis de ATP puede ocurrir en ausencia de oxidación de H_2O por un proceso de fotofosforilación cíclica en el que el PSII no participa. El pigmento P700 del PSI absorbe la luz, pasa a la ferredoxina y regresa al centro de reacción del PSI con deficiencia de electrones mediante el citocromo b_6f. Cuando los electrones recorren la vía cíclica, los protones se trasladan a la luz tilacoide y luego impulsan la formación de ATP (pág. 228).

Durante las reacciones dependientes de la luz, la energía química almacenada en NADPH y ATP se usa para sintetizar carbohidratos a partir de CO_2. El CO_2 se convierte en carbohidrato por la vía C_3 (o ciclo de Calvin) en la que la carboxilasa de difosfato de ribulosa (Rubisco) fija el CO_2 a un compuesto de cinco carbonos, el difosfato de ribulosa, y forma un intermediario inestable de seis carbonos, que se divide en dos moléculas de ácido 3-fosfoglicérico. El NADPH y el ATP se utilizan para convertir las moléculas de PGA en fosfato de gliceraldehído. Por cada seis moléculas de CO_2 que se fijan, dos moléculas de fosfato de gliceraldehído pueden dirigirse a la formación de sacarosa o almidón, mientras que las 10 moléculas restantes pueden usarse para regenerar el difosfato de ribulosa para las rondas siguientes de fijación de dióxido de carbono (pág. 229).

La enzima Rubisco también puede catalizar una reacción en la que el O_2, y no el CO_2, se une en forma covalente con el difosfato de ribulosa. Este proceso, que se conoce como fotorrespiración, conduce a la formación de compuestos que se metabolizan en reacciones que llevan a la pérdida de CO_2. Como la fotorrespiración comprende captación de O_2 y liberación de CO_2, representa un desperdicio de la energía de la planta. La proporción entre la fotorrespiración y la fijación del CO_2 depende del índice CO_2/O_2 al que la enzima Rubisco se enfrente. Dos grupos de plantas, plantas C_4 y CAM, tienen mecanismos que incrementan esta proporción (pág. 232).

Las plantas C_4 y CAM tienen una enzima adicional para la fijación del CO_2, la carboxilasa de fosfoenolpiruvato, que es capaz de operar a niveles muy bajos de CO_2. Las plantas C_4 poseen una estructura única en sus hojas que contiene un cilindro exterior de células mesófilas y un cilindro interno de células de la vaina del haz que se sellan a los gases atmosféricos. La carboxilasa del PEP opera en los mesófilos, donde el CO_2 se fija al compuesto de tres carbonos fosfoenolpiruvato (PEP) para formar un ácido de cuatro carbonos, que se transporta a la vaina del haz, donde se descarboxila. El CO_2 liberado en la vaina del haz se acumula en altas concentraciones, lo que favorece la fijación del CO_2 con el difosfato de ribulosa y la formación de PGA y fosfato de gliceraldehído por el ciclo de Calvin. Las plantas CAM efectúan las reacciones dependientes de la luz y las independientes de la luz en horarios diferentes del día. Las plantas CAM mantienen sus estomas cerrados durante las horas calientes y secas del día, con lo que evitan la pérdida de agua. Luego, por la noche, abren los estomas y fijan el CO_2 mediante la carboxilasa de PEP. El ácido málico que se produce en estas reacciones se almacena en la vacuola hasta las horas diurnas, cuando el compuesto se regresa al cloroplasto. Ahí libera CO_2, que puede fijarse con Rubisco en condiciones de niveles bajos de CO_2 y convertirse en carbohidrato con la energía del ATP y el NADPH generados por las reacciones dependientes de la luz (pág. 234).

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. ¿Cuál de los dos fotosistemas opera con el potencial redox más negativo? ¿Cuál genera el agente reductor más potente? ¿Cuál debe absorber cuatro fotones durante cada ronda de fotofosforilación no cíclica?
2. ¿Qué tipo de planta (C_3, C_4 o CAM) se esperaría que funcionara mejor si se expusiera a la luz diurna continua en condiciones cálidas y secas? ¿Por qué?
3. ¿Cuál de las siguientes sustancias: PQH_2, citocromo b_6 reducido, ferredoxina reducida, $NADP^+$, NADPH, O_2, H_2O, es el agente reductor más potente? ¿Cuál es el agente oxidante más fuerte? ¿Cuál tiene mayor afinidad por los electrones? ¿Cuál tiene los electrones más energéticos?
4. Supóngase que se va a agregar el separador dinitrofenol (DNP; pág. 198) a una preparación de cloroplastos que realiza fotosíntesis. ¿Cuál de las siguientes actividades se esperaría que se afectara? 1) Absorción de luz, 2) fotofosforilación cíclica, 3) transporte de electrones entre PSII y PSI, 4) fotofosforilación no cíclica, 5) síntesis de PGA y 6) reducción de $NADP^+$.
5. Calcular la fuerza motriz de protones que se formaría a través de una membrana tilacoide que mantuviera una diferencia de 10 000 veces en $[H^+]$ y ninguna diferencia en el potencial eléctrico. (La ecuación para la fuerza motriz de protones se encuentra en la página 198.)
6. ¿En qué condiciones se esperaría que una planta realizara la fotofosforilación cíclica más intensa?
7. Contrastar el cambio en el pH del medio que ocurre cuando los cloroplastos aislados llevan a cabo la fotosíntesis en comparación con mitocondrias aisladas que realizan la respiración aeróbica.

8. En el capítulo anterior se señaló que la mayor parte de la fuerza motriz de protones en las mitocondrias se expresa como voltaje. En contraste, la fuerza motriz de protones que se genera durante la fotosíntesis se expresa casi de manera exclusiva como gradiente de pH. ¿Cómo pueden explicarse estas diferencias?
9. Comparar las funciones del PSI y el PSII en la generación del gradiente electroquímico a través de la membrana tilacoide.
10. ¿Habría acuerdo en cuanto a que una planta C_3 tiene que gastar más energía por cada molécula de CO_2 que convierte en carbohidrato que una planta C_4? ¿Por qué?
11. En la fotosíntesis, la captura de la energía lumínica produce la liberación y la transferencia ulterior de electrones. ¿De qué moléculas provienen originalmente los electrones? ¿En qué moléculas terminan estos electrones?
12. ¿Cuántas moléculas de ATP y NADPH se requieren en la vía C_3 para formar un azúcar de seis carbonos? Si la síntesis de una molécula de ATP necesitara cuatro protones, ¿se esperaría que estos requerimientos relativos de ATP y NADPH se cubrieran con la fotofosforilación no cíclica en ausencia de fotofosforilación cíclica?
13. Si la feofitina y la A_0 (una molécula de clorofila *a*) son los receptores primarios de electrones del PSII y el PSI, respectivamente, ¿cuáles son los donantes primarios de electrones de cada fotosistema?
14. Comparar las funciones de tres átomos metálicos diferentes en las reacciones dependientes de la luz de la fotosíntesis.
15. ¿Se esperaría que el efecto invernadero (incremento del contenido de CO_2 de la atmósfera) tuviera un mayor impacto en las plantas C_4 o en las C_3? ¿Por qué?
16. ¿Se esperaría que el contenido de agua atmosférica fuera un factor importante en el éxito de una planta C_3? ¿Por qué?
17. Se sugirió que los niveles bajos de CO_2 tienen una participación clave en el mantenimiento de niveles estables de O_2 de 21%. ¿Cómo es posible que los niveles de CO_2 afecten los niveles de O_2 en la atmósfera?
18. Supóngase que los niveles de CO_2 se elevaran a 600 ppm, lo que tal vez fue cierto hace 300 millones de años. ¿Qué efecto se cree que podría tener en la competencia entre las plantas C_3 y las C_4?
19. Asúmase que se coloca una planta C_3 en condiciones calientes y secas y se le aporta $^{18}O_2$ marcado con radiactividad. ¿En qué compuestos se esperaría encontrar esta marca?

SITIO EN INTERNET www.wiley.com/college/karp

Las animaciones y los videos indicados en este capítulo pueden visitarse en el sitio de Cell and Molecular Biology de Karp en Internet. También hallará todas las respuestas a las preguntas analíticas recién planteadas, autoexámenes que le ayudarán a prepararse para los exámenes, y vínculos con fascinantes recursos. La sección lecturas adicionales que sigue se amplía en el sitio en Internet.

LECTURAS ADICIONALES

Allen, J. F. 2002. Photosynthesis of ATP—electrons, proton pumps, rotors, and poise. *Cell* 110:273–276.

Bricker, T. M. 2006. A time-resolved vibrational spectroscopy glimpse into the oxygen-evolving complex of photosynthesis. *PNAS* 103:7205–7206.

Chitnis, P. R. 2001. Photosystem I: function and physiology. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:593–626.

Dekker, J. P. & Boekema, E. J. 2005. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1706:12–39.

Griffiths, H. 2006. Designs on Rubisco. *Nature* 441:940–941.

Heathcote, P., et al. 2002. Reaction centres: the structure and evolution of biological solar power. *Trends Biochem. Sci.* 27:79–87.

Iwata, S. & Barber, J. 2004. Structure of photosystem II and molecular architecture of the oxygen-evolving centre. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14: 447–453.

McFadden, G. I. & van Dooren, G. G. 2004. Red algal genome affirms a common origin of all plastids. *Curr. Biol.* 14:R514–R516.

Nelson, N. & Ben-Shem, A. 2004. The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 5:971–982.

Normile, D. 2006. Consortium aims to supercharge rice photosynthesis. *Science* 313:423.

Penner-Hahn, J. E. & Yocum, C. F. 2005. The photosynthesis "oxygen clock" gets a new number. *Science* 310:982–983.

Raven, J. A. & Karley, A. J. 2006. Carbon sequestration: photosynthesis and subsequent processes. *Curr. Biol.* 16:R165–R167.

Rutherford, A. W. & Boussac, A. 2004. Water photolysis in biology. *Science* 303:1782–1784.

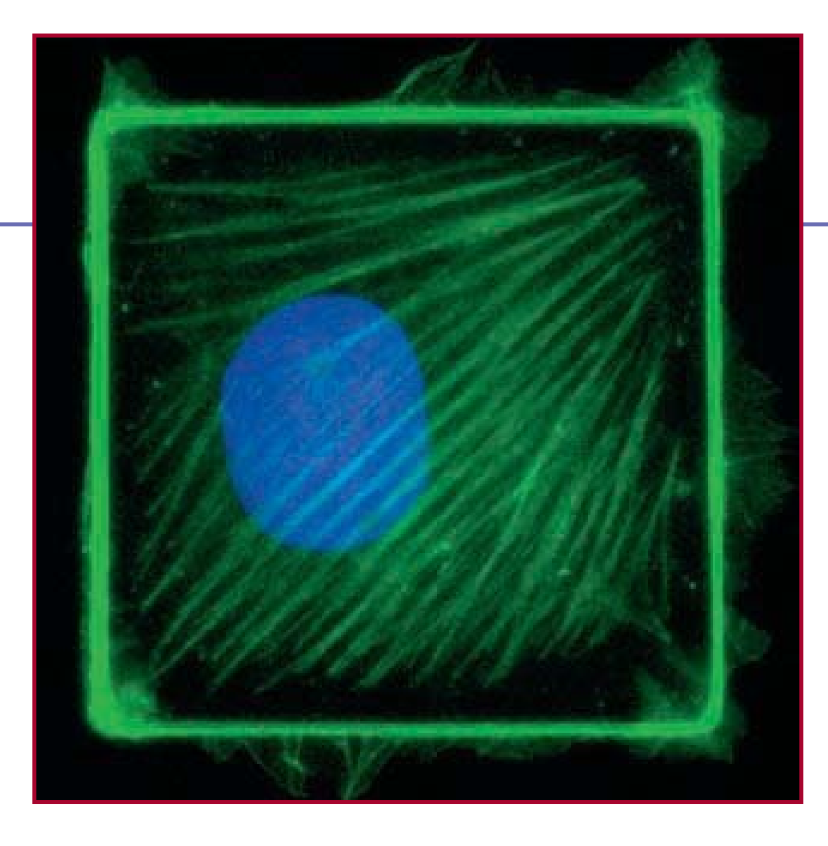
Saenger, W., et al. 2002. The assembly of protein subunits and cofactors in photosystem I. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12:244–254.

Smith, J. L., et al. 2004. Cytochrome bc_1 complexes: a common core of structure and function surrounded by diversity in the outlying provinces. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14:432–439.

Spreitzer, R. J. & Salvucci, M. E. 2002. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 53:449–475.

Tolbert, N. E. 1997. The C_2 oxidative photosynthetic carbon cycle. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 48:1–25.

CAPÍTULO



Interacciones entre las células y su ambiente

Aunque la membrana plasmática constituye un límite entre una célula viva y su ambiente no vivo, los materiales presentes fuera de la membrana plasmática tienen un papel importante en la vida de una célula. La mayoría de las células de una planta o un animal están organizadas en tejidos bien definidos en los que las células mantienen una relación definida entre sí y con los materiales extracelulares que están entre las células. Incluso las células que carecen de relaciones fijas dentro de un tejido sólido, como los leucocitos que vigilan el cuerpo, deben interactuar en formas muy específicas con otras células y con materiales extracelulares con los que entran en contacto. Estas interacciones regulan actividades tan diversas como la migración, crecimiento y diferenciación de las células, además determinan la organización tridimensional de los tejidos y órganos que surgen durante el desarrollo embrionario.

Micrografía con fluorescencia de una célula endotelial (un tipo de célula que recubre la superficie interna de los vasos sanguíneos). La célula es cuadrada porque se extiende sobre un parche cuadrado diminuto de una proteína adhesiva llamada fibronectina que se aplicó al platillo de cultivo. La célula parece montada en un marco verde porque se trató con un anticuerpo verde fluorescente que se une con la proteína citoplásmica actina, un componente del citoesqueleto. (Reimpresa a partir de Christopher S. Chen, Clifford Brangwynne y Donald E. Ingber, Trends Cell Biol 9:283, 1999; © 1999, con autorización de Elsevier Science.)

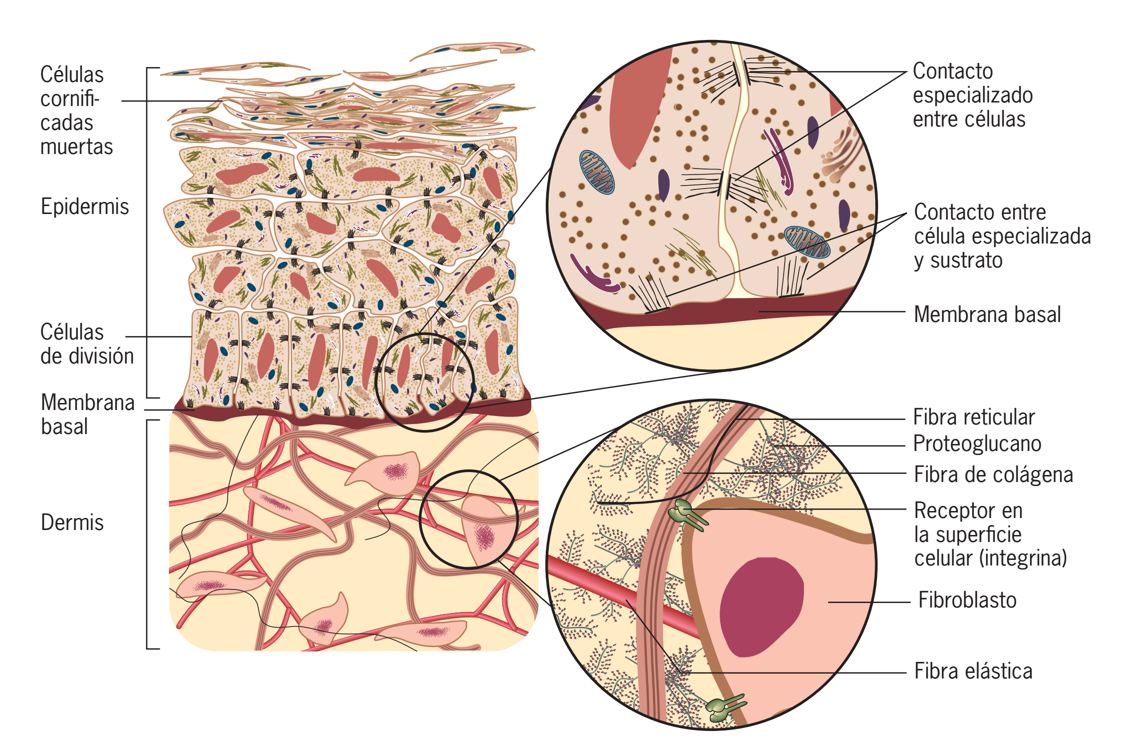


FIGURA 7-1 Revisión de la forma en que se organizan las células en tejidos e interactúan entre sí y con su ambiente extracelular. En este esquema de un corte de la piel humana se advierte que las células de la epidermis se adhieren entre sí mediante contactos especializados. La capa basal de las células epidérmicas también se adhiere a una capa subyacente no celular (la membrana basal). La dermis consiste sobre todo en elementos extracelulares que interactúan unos con otros y con las superficies de las células dispersas (sobre todo fibroblastos). Las células contienen receptores que interactúan con los materiales extracelulares.

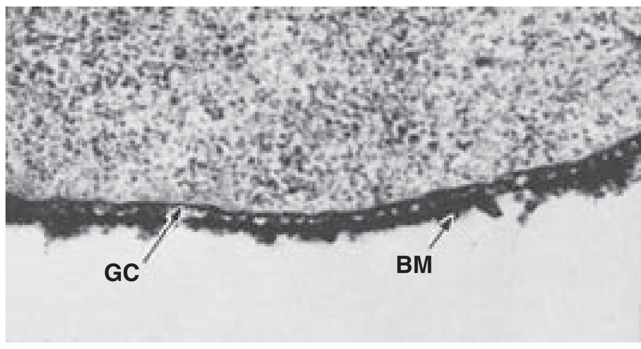
Este capítulo se enfoca en el ambiente extracelular y los tipos de interacciones en las que participan las células. La figura 7-1 muestra un corte esquemático de la piel humana y presenta una revisión de varios de los temas que se tratan en este capítulo. La capa externa de la piel (la epidermis) es un tipo de **tejido epitelial**. Al igual que otros epitelios que recubren espacios dentro del cuerpo, la epidermis consiste sobre todo en células muy próximas unidas entre sí y con una capa no celular subyacente mediante contactos especializados (mostrados en el recuadro superior de la figura 7-1). Estos contactos proporcionan un mecanismo para que las células se adhieran y se comuniquen entre sí. En cambio, la capa más profunda de la piel (la dermis) es un tipo de **tejido conjuntivo**. Al igual que otros tejidos conjuntivos, como los que forman un tendón o cartílago, la dermis consiste sobre todo en material extracelular, incluidas varias fibras distintas que interactúan entre sí de maneras específicas. Una mirada más cercana a una de las células dispersas (fibroblastos) de la dermis muestra que la capa externa de la membrana plasmática contiene receptores que median las interacciones entre la célula y los componentes de su ambiente (mostrados en el recuadro inferior de la figura 7-1). Estos receptores de la superficie celular no sólo interactúan con el medio externo, sino que además su extremo interno está conectado con varias proteínas citoplásmicas. Los receptores con este tipo de unión doble son muy adecuados para transmitir mensajes entre la célula y su ambiente. ●

7.1 EL ESPACIO EXTRACELULAR

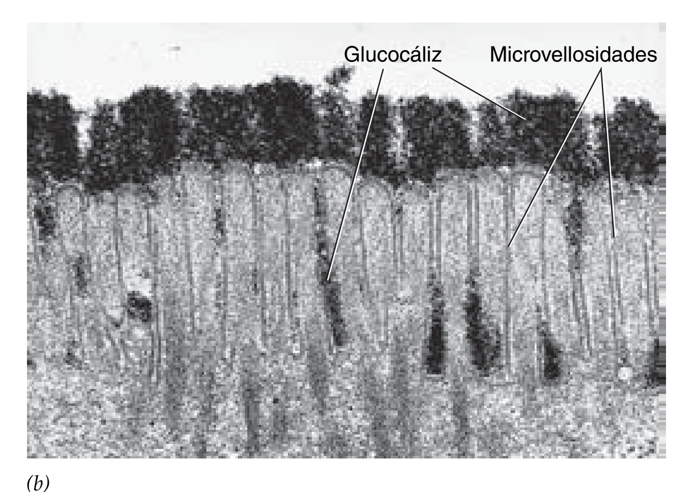
Si se comienza en la membrana plasmática y se inicia un desplazamiento hacia fuera, se pueden examinar los tipos de elementos extracelulares que rodean a diversos tipos de células. En el capítulo 4 se señaló que todas las proteínas integrales de la membrana plasmática, así como ciertos lípidos de membrana, tienen cadenas de azúcares (oligosacáridos) de longitud variable que se proyectan al exterior de la membrana plasmática (véase fig. 4-4*c*). Estas proyecciones de carbohidratos forman parte de una capa aplicada a la superficie externa de la membrana plasmática, el **glucocáliz** (o *cubierta celular*) (fig. 7-2*a*). Este material extracelular es muy prominente en algunos tipos de células, como las epiteliales que recubren el tubo digestivo de los mamíferos (fig. 7-2*b*). Se cree que el glucocáliz media las interacciones entre células y entre las células y el sustrato, suministra protección mecánica a las células, sirve como barrera contra partículas que se mueven hacia la membrana plasmática y se une con factores reguladores importantes que actúan sobre la superficie celular.

La matriz extracelular

Muchos tipos de células animales están rodeadas por una **matriz extracelular (ECM)**, una red organizada de materiales extracelulares que se encuentra más allá de la proximidad inmediata de

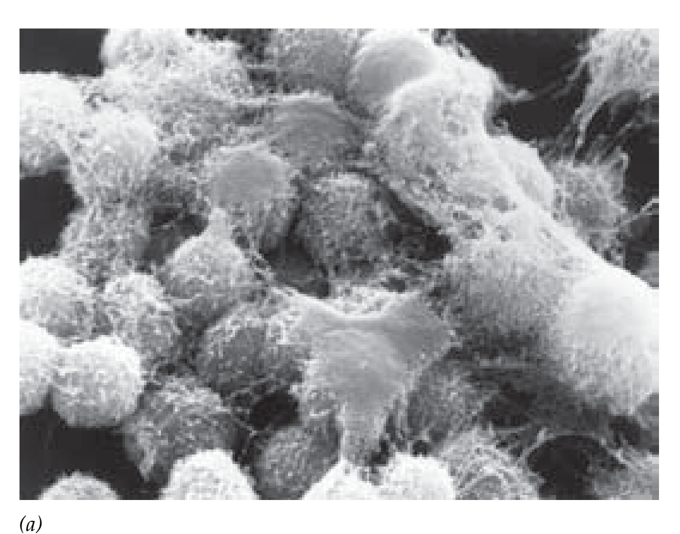


(a)

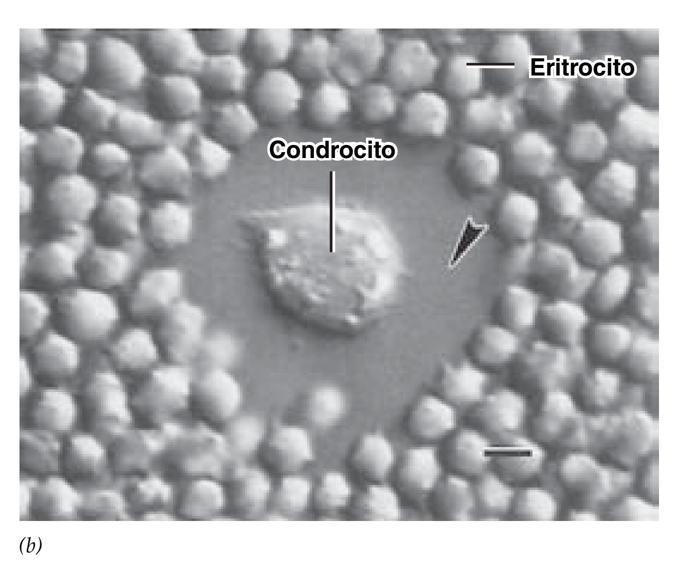


(b)

FIGURA 7-2 El glucocáliz. *a*) Superficie basal de una célula ectodérmica de un embrión joven de pollo. Pueden distinguirse dos estructuras aplicadas a la superficie celular externa: un glucocáliz interno (GC) y una membrana basal externa (BM). *b*) Esta micrografía electrónica de la superficie apical de una célula epitelial del recubrimiento del intestino muestra el glucocáliz extenso, que se tiñó con la proteína ferritina, que contiene hierro. (*A*, TOMADA DE A. MARTINEZ-PALOMO, INT REV CYTOL 29:64, 1970; *B*, TOMADA DE S. ITO Y D. W. FAWCETT/PHOTO RESEARCHERS.)



(a)

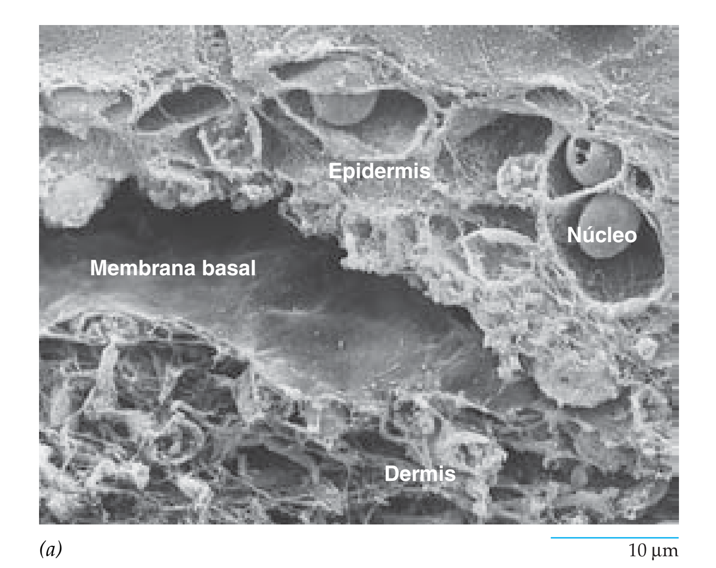


(b)

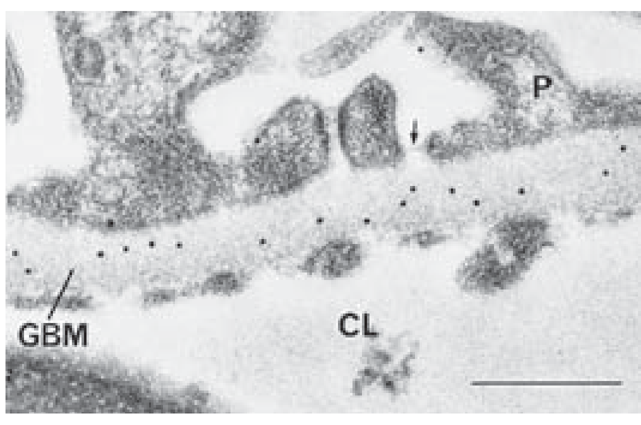
FIGURA 7-3 Matriz extracelular (ECM) de células de cartílago. *a*) Micrografía electrónica de barrido de parte de una colonia de células de cartílago (condrocitos) que muestra los materiales extracelulares secretados por las células. *b*) La ECM de un condrocito individual se ha hecho visible agregando una suspensión de eritrocitos (RBC). El espesor de la ECM es evidente por el espacio claro (punta de flecha) que no es penetrado por los RBC. La barra representa 10 µm. (*A*, MICHAEL SOLURSH Y GERALD KARP; *B*, CORTESÍA DE GRETA M. LEE, BRIAN JOHNSTON, KEN JACOBSON Y BRUCE CATERSON.)

la membrana plasmática (fig. 7-3). La ECM es más que material inerte de empaque o un pegamento inespecífico que mantiene las células unidas; a menudo posee un papel regulador clave para determinar la forma y las actividades de la célula. Por ejemplo, la digestión enzimática de la ECM que rodea a las células de cartílago cultivadas o las células epiteliales de la glándula mamaria produce un descenso notorio de las actividades sintéticas y secretoras de las células. La adición de los materiales de la matriz extracelular al cultivo puede restaurar el estado diferenciado de las células y su capacidad para sintetizar sus productos usuales (véase fig. 7-29).

Una de las matrices extracelulares mejor definidas es la **membrana basal** (o lámina basal), una hoja continua de 50 a 200 nm de grosor que: a) rodea a las células musculares y adiposas; b) se encuentra bajo la superficie basal de los tejidos epiteliales, como la epidermis (figs. 7-1 y 7-4*a*), o el recubrimiento del tubo digestivo y las vías respiratorias, y c) está bajo el recubrimiento endotelial de los vasos sanguíneos. Las membranas basales confieren soporte mecánico a las células que se unen a ellas, generan señales que mantienen la supervivencia celular, sirven como sustrato para la migración celular, separan tejidos adyacentes dentro de un órgano y actúan como barrera al paso de macromoléculas. Con respecto a esta última actividad, las membranas basales poseen un papel importante en la prevención de la salida de proteínas de la sangre hacia los tejidos. Esto representa una importancia especial en los riñones, donde la sangre se filtra a gran presión por una membrana basal de doble capa que separa los capilares del glomérulo de la pared de los túbulos renales (fig. 7-4*b*). La insuficiencia renal crónica en los diabéticos puede ser resultado del engrosamiento anormal de las membranas basales que rodean a los glomérulos. Las membranas basales también



(a)



(b)

FIGURA 7-4 La membrana basal (lámina basal). *a*) Micrografía electrónica de barrido de la piel humana. La epidermis se separó de una parte de la membrana basal, que se ve por debajo de las células epidérmicas. *b*) Se forma una membrana basal más gruesa de lo usual entre los vasos sanguíneos del glomérulo y el extremo proximal de los túbulos renales. Esta capa extracelular tiene un papel importante en la filtración de líquido que se ve forzado a salir de los capilares hacia los túbulos renales durante la formación de orina. Los puntos negros dentro de la membrana basal del glomérulo (GBM) son partículas de oro unidas con anticuerpos que se unen con las moléculas de colágena tipo IV en la membrana basal (CL, luz capilar; P, podocito del túbulo). La barra representa 0.5 μm. (*A*, CORTESÍA DE KAREN HOLBROOK; *B*, TOMADA DE MICHAEL DESJARDINS Y M. BENDAYAN, J CELL BIOL 113:695, 1991. CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DEL ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

sirven como barrera contra la invasión de tejidos por células cancerosas. La organización molecular de las membranas basales se describe más adelante (véase fig. 7-12).

Aunque la matriz extracelular puede tomar diversas formas en diferentes tejidos y organismos, tiende a estar compuesta por macromoléculas similares. A diferencia de la mayoría de las proteínas presentes dentro de las células que son moléculas compactas y globulares, las del espacio extracelular casi siempre son *fibrosas* y extendidas. En el espacio extracelular, estas proteínas pueden disponerse por sí mismas en una red tridimensional

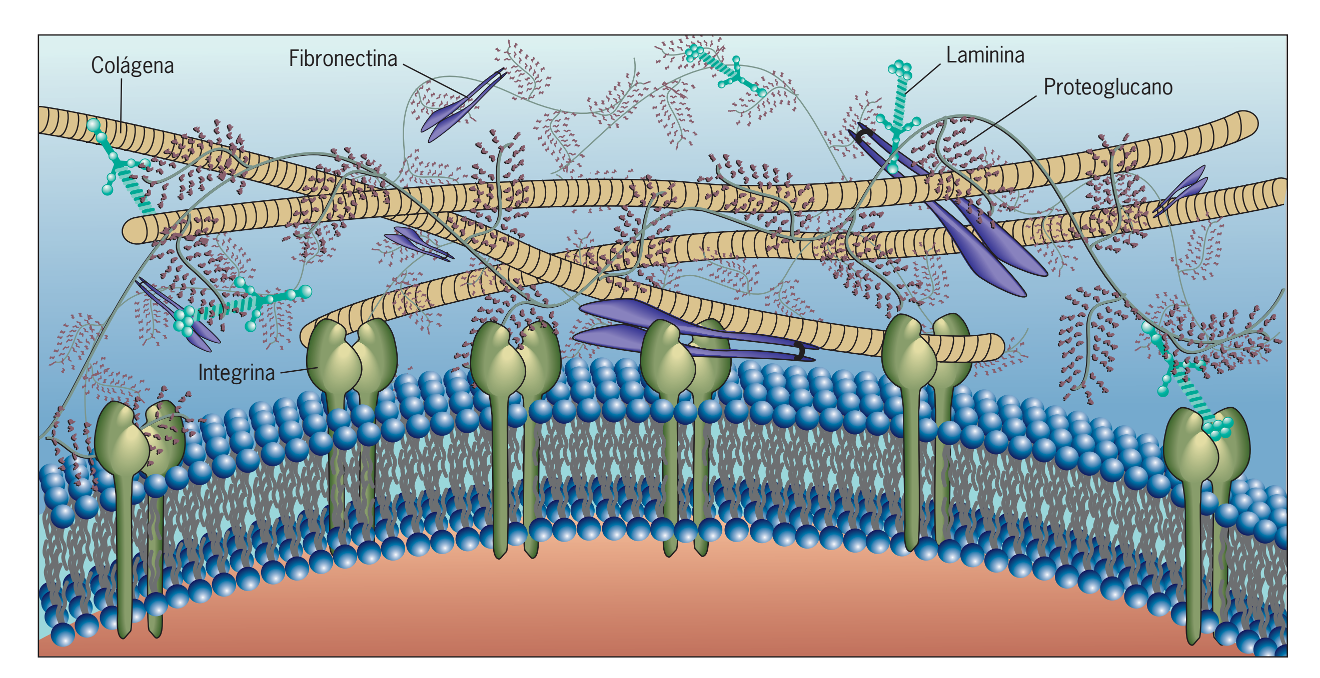


FIGURA 7-5 Revisión de la organización macromolecular de la matriz extracelular. Las proteínas y polisacáridos mostrados en esta ilustración se describen en las secciones siguientes. Las proteínas presentadas (fibronectina, colágena y laminina) contienen sitios de unión para unas y otras, además de sitios de unión para receptores (integrinas) que se localizan en la superficie celular. Los proteoglucanos son enormes complejos de proteína y polisacáridos que ocupan gran parte del volumen del espacio extracelular.

interconectada que se muestra en la figura 7-5 y se describe en las secciones siguientes. Entre sus diversas funciones, las proteínas de la ECM sirven como andamios, vigas, cables y pegamento. Como se advierte en toda la descripción que sigue, las alteraciones de la secuencia de aminoácidos de las proteínas extracelulares pueden ocasionar trastornos graves. Primero se describe una de las moléculas más importantes y ubicuas de la ECM, la glucoproteína colágena.

Colágena Las **colágenas** son una familia de glucoproteínas fibrosas que sólo están presentes en las matrices extracelulares. Las colágenas se hallan en todo el reino animal y se distinguen por su gran fuerza tensil, es decir, que resisten el estiramiento. Se estima que una fibra de colágena de 1 mm de diámetro es capaz de mantener suspendido un peso de 10 kg sin romperse. La colágena es la proteína individual más abundante en el cuerpo humano (representa más de 25% de todas las proteínas), un hecho que refleja la presencia diseminada de los materiales extracelulares.

La colágena se produce sobre todo en los fibroblastos, las células que se encuentran en varios tipos de tejido conjuntivo, y también en las células epiteliales y de músculo liso. Se han identificado 27 tipos distintos de colágena. Cada tipo se limita a sitios particulares del cuerpo, pero a menudo hay dos o más tipos distintos juntos en la misma ECM. Se alcanza una mayor complejidad funcional porque varios tipos de colágena se combinan dentro de la misma fibra. Estas fibras "heterotípicas" son el equivalente biológico a una aleación metálica. Es probable que las diferentes propiedades estructurales y mecánicas se deban a las diversas mezclas de colágenas en las fibras. Aunque hay muchas diferencias entre los integrantes de la familia de la colágena, todas comparten por lo menos dos rasgos estructurales importantes. Primero, todas las moléculas de colágena son trímeros formados por tres cadenas polipeptídicas, llamadas cadenas alfa. Segundo, por lo menos en una parte de su extensión, las tres cadenas polipeptídicas de una molécula de colágena están entretejidas unas con otras para formar una hélice triple única, parecida a un bastón (fig. 7-6*a*).

Las cadenas α de las moléculas de colágena contienen grandes cantidades de prolina, y muchos de los residuos de prolina (y lisina) son hidroxilados después de la síntesis del polipéptido. Los aminoácidos hidroxilados son importantes para mantener la estabilidad de la triple hélice a través de la formación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas componentes. La incapacidad de hidroxilar cadenas de colágena tiene graves consecuencias para la estructura y la función de los tejidos conjuntivos. Esto es puesto en evidencia por los síntomas del escorbuto, una enfermedad debida a deficiencia de vitamina C (ácido ascórbico) y se caracteriza por inflamación gingival y pérdida de dientes, cicatrización deficiente de heridas, fragilidad ósea y debilitamiento del recubrimiento de los vasos sanguíneos, lo que ocasiona hemorragia interna. El ácido ascórbico es requerido como coenzima por las enzimas que agregan grupos hidroxilo a los aminoácidos lisina y prolina de la colágena.

Varios tipos de colágenas, incluidos los tipos I, II y III, se describen como *colágenas fibrilares* porque se disponen en fibrillas rígidas parecidas a cables, que a su vez se disponen en fibras más gruesas, casi siempre lo bastante grandes para verse con el microscopio óptico. La figura 7-6*b*, *c* muestra el empaque lado a lado de las hileras de moléculas de colágena I dentro de una fibrilla de colágena. Las fibrillas se fortalecen por enlaces covalentes entre residuos de lisina e hidroxilisina en moléculas adyacentes de colágena. Este proceso de enlace cruzado conti-

(a)

(b)

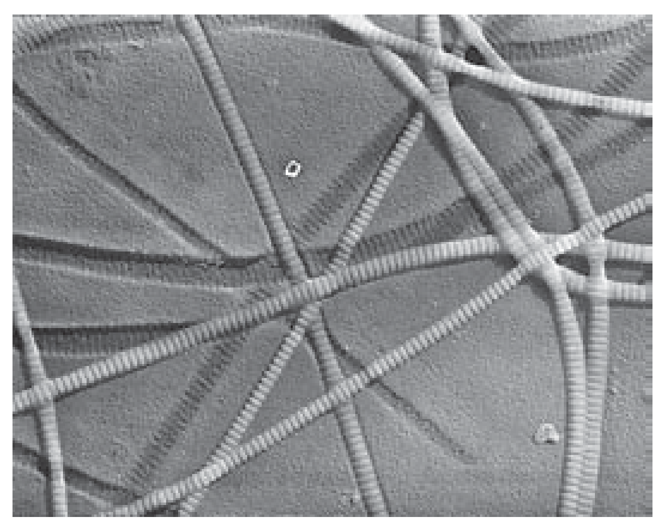


FIGURA 7-6 La estructura de la colágena I. Esta figura muestra varios niveles de organización de la colágena. *a*) La molécula de colágena (o monómero) es una triple hélice compuesta por tres cadenas helicoidales alfa. Algunos tipos de colágena contienen tres cadenas alfa idénticas, por lo que son homotrímeros, en tanto que otras son heterotrímeros que tienen dos o tres cadenas distintas. Cada molécula de colágena I mide 295 nm de largo. *b*) Las moléculas de colágena se alinean en hileras en las que las moléculas de una fila están escalonadas respecto de la hilera contigua. Un haz de moléculas de colágena, como el que se muestra, forma una fibrilla de colágena. La disposición escalonada de moléculas produce bandas (líneas negras horizontales en la ilustración) a través de la fibrilla que se repiten cada 67 nm (iguales a la longitud de la hendidura entre moléculas más la superposición). *c*) Micrografía electrónica de las fibras de colágena humana después de sombreado metálico (véase fig. 18-15). El patrón de bandas de las fibras refleja el patrón de bandas de las fibrillas que la forman. (*C*, Cortesía de Jerome Gross y Francis O. Schmitt.)

núa durante toda la vida y es probable que contribuya a la disminución de la elasticidad de la piel y el aumento de la fragilidad ósea en los ancianos.

Entre los diversos componentes de la ECM, las moléculas de colágena proporcionan un marco insoluble que determina muchas de las propiedades mecánicas de la matriz. De hecho, a menudo pueden relacionarse las propiedades de un tejido particular con la organización tridimensional de estas moléculas de colágena. Por ejemplo, los tendones, que conectan los músculos con los huesos, deben resistir fuerzas de tracción muy grandes durante los momentos de contracción muscular. Los tendones contienen una ECM en la que las fibras de colágena se alinean paralelas al eje longitudinal del tendón, y paralelas a la dirección de las fuerzas de tracción. La córnea también es un tejido importante; debe servir como una capa durable y protectora en la superficie del globo ocular, pero también debe ser transparente para que la luz pueda pasar por el cristalino hasta la retina. La capa media gruesa de la córnea es el estroma, que contiene fibrillas de colágena relativamente cortas que se organizan en capas distintivas. La estructura en capas del estroma es similar a la de la madera contrachapada: las fibrillas de cada capa son paralelas a las otras fibrillas en la capa, pero perpendiculares a las fibrillas de las capas que están a ambos lados (fig. 7-7). Esta estructura parecida a la madera contrachapada suministra fuerza a este delicado tejido al tiempo que la uniformidad del tamaño y el empaque ordenado de las fibrillas minimiza la dispersión de los rayos de luz entrantes, lo que hace posible la transparencia del tejido.

En virtud de la abundancia y la amplia distribución, no es sorprendente que las alteraciones de la formación de la colágena fibrilar produzcan trastornos graves. Las quemaduras o las lesiones traumáticas en órganos internos pueden dar lugar a la acumulación de tejido cicatrizal, el cual consiste sobre todo en colágena fibrilar. Las mutaciones en los genes que codifican la colágena tipo I pueden ocasionar *osteogénesis imperfecta*, un trastorno que puede ser fatal y se caracteriza por fragilidad ósea extrema, piel delgada y tendones débiles. Las mutaciones en los genes que codifican la colágena tipo II alteran las propiedades del tejido cartilaginoso y causan enanismo y deformidades esqueléticas. Las mutaciones en varios genes más de la colágena pueden provocar defectos diferentes, pero relacionados, en la estructura de la matriz de colágena (llamados *síndromes de Ehlers-Danlos*). Las personas con uno de estos síndromes tienen articulaciones demasiado flexibles y piel muy extensible.

No todas las colágenas forman fibrillas. Una de las colágenas no fibrilares es la tipo IV, cuya distribución se limita a las membranas basales. Las membranas basales son hojas delgadas de soporte y las moléculas de colágena tipo IV se organizan en una red que le confiere soporte mecánico y sirve como celosía para que se depositen otros materiales extracelulares (véase fig. 7-12). A diferencia de la colágena tipo I que posee una hélice triple larga y continua, el trímero de colágena tipo IV posee segmentos no helicoidales intercalados a lo largo de la molécula, además de dominios globulares en ambos extremos. Los segmentos no helicoidales hacen que la molécula sea flexible, en tanto que los extremos globulares sirven como sitios de interacción entre las moléculas, lo que le da su carácter complejo parecido

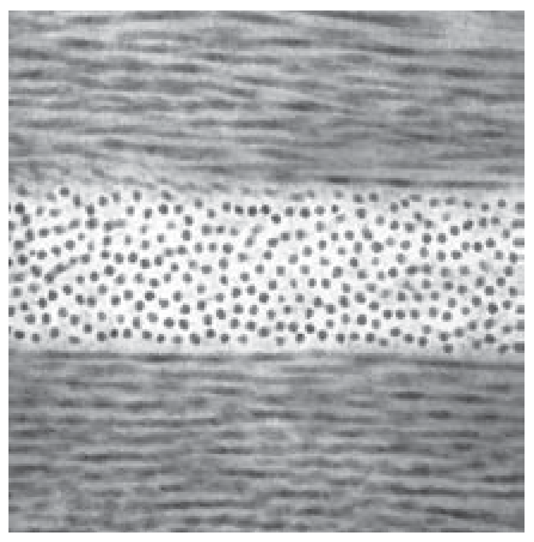


FIGURA 7-7 El estroma corneal posee sobre todo capas de fibrillas de colágena con diámetro y espacios uniformes. Las moléculas de las capas alternadas se disponen en ángulos rectos entre sí, por lo que simulan la estructura de la madera contrachapada. (Reimpresa de Nigel J. Fullwood, Structure 12:169, 2004; Copyright 2004, con autorización de Elsevier Science.)

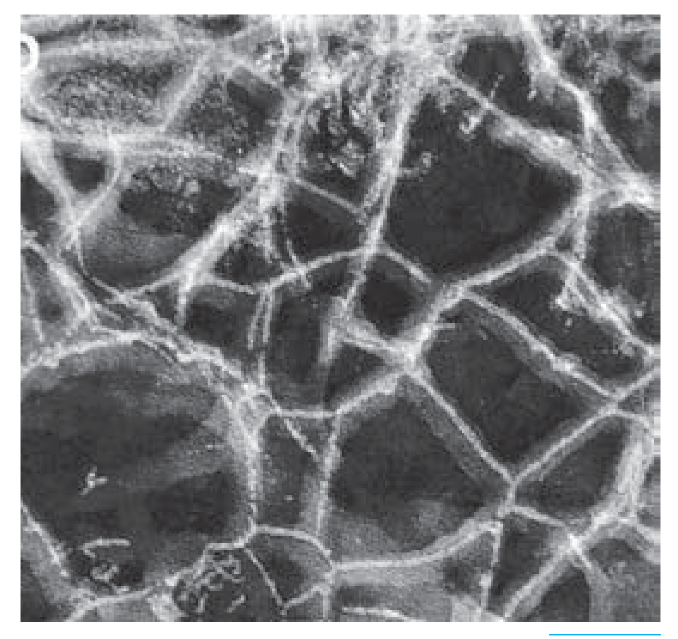


FIGURA 7-8 La red de colágena tipo IV de la membrana basal. Micrografía electrónica de una membrana basal de tejido amniótico humano que se extrajo con una serie de soluciones salinas para retirar los materiales distintos de la colágena. El tratamiento deja una red extensa, ramificada y poligonal de hebras que forman una celosía irregular. La evidencia indica que esta celosía consiste en moléculas de colágena tipo IV entrelazadas entre sí en una estructura tridimensional compleja. La figura 7-12 muestra un modelo del andamiaje de la membrana basal. (Tomada de Peter D. Yurchenco y George C. Ruben, J Cell Biol 105:2561, 1987. Con autorización de los derechos reservados de Rockefeller University Press.)

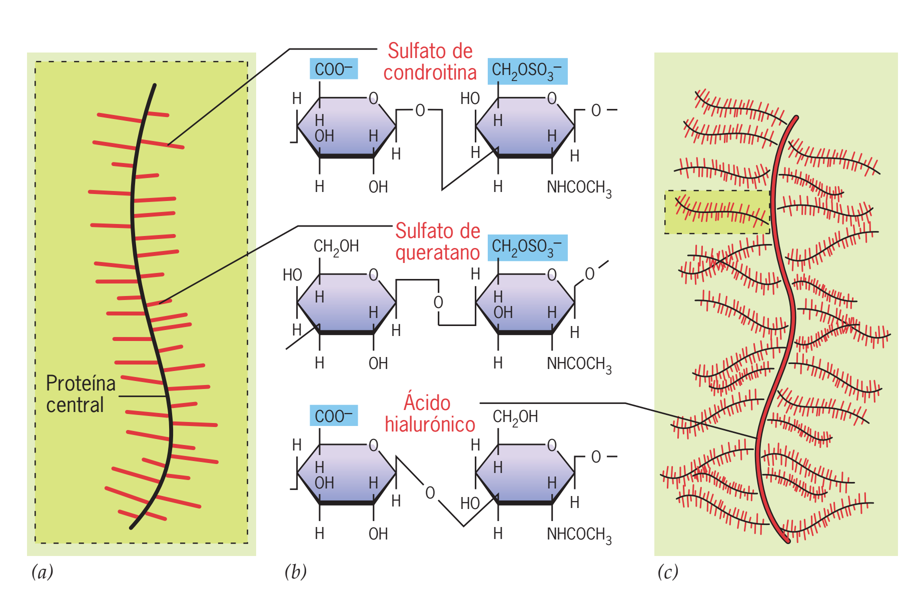
a una celosía (fig. 7-8). Se han identificado mutaciones en los genes de la colágena tipo IV en pacientes con *síndrome de Alport*, que es una enfermedad renal hereditaria en la que la membrana basal del glomérulo (fig. 7-4*b*) está interrumpida.

Proteoglucanos Además de la colágena, las membranas basales y otras matrices extracelulares casi siempre contienen grandes cantidades de un tipo distintivo de complejo proteína-polisacárido denominado **proteoglucano**. Un proteoglucano (fig. 7-9*a*) consiste en una molécula de proteína central (mostrada en negro en la figura 7-9*a*) a la cual se le unen por enlaces covalentes cadenas de *glucosaminoglucanos* (GAG) (en la figura aparecen en rojo). Cada cadena de glucosaminoglucano se forma de un disacárido repetido, esto es, que tiene una estructura -A-B-A-B-A-, en la que A y B representan dos azúcares distintos. Los GAG son muy ácidos por la presencia de grupos sulfato y carboxilo unidos a los anillos de los azúcares (fig. 7-9*b*). Los proteoglucanos de la matriz extracelular pueden ensamblarse en complejos gigantes mediante la unión de sus proteínas centrales a una molécula de *ácido hialurónico*, un GAG sin sulfato (fig. 7-9*c*). La figura 7-9*d* muestra la apariencia microscópica de uno de estos complejos, que puede ocupar un volumen equivalente al de una célula bacteriana.

A causa de las cargas negativas producidas en los GAG sulfatados, los proteoglucanos se unen con cantidades enormes de cationes, los que a su vez se unen con muchas moléculas de agua. Como resultado, los proteoglucanos forman un gel hidratado poroso que llena el espacio extracelular como material de empaque (fig. 7-5) y resiste las fuerzas de aplastamiento (compresión). Esta propiedad complementa la de las moléculas adyacentes de colágena, que resisten a las fuerzas de tracción y proporcionan un andamiaje para los proteoglucanos. En conjunto, las colágenas y los proteoglucanos dan al cartílago y también a otras matrices extracelulares fuerza y resistencia a la deformación. La matriz extracelular del hueso también se compone de colágena y proteoglucanos, pero se endurece por la impregnación con sales de fosfato de calcio.

Además de actuar como componentes importantes de la ECM, un grupo de proteoglucanos, los *proteoglucanos heparán sulfato* (HSPG), funcionan directamente en la superficie celular. Entre los miembros de este grupo se incluyen los sindecanos, cuya proteína central atraviesa la membrana plasmática. Los GAG, que se unen al dominio extracelular de la proteína, interactúan con diversas proteínas, incluidos importantes factores de crecimiento. Se especula que los GAG podrían proteger al factor de crecimiento contra la degradación e influir en la interacción de dicho factor con su propio receptor en la superficie celular. Los GAG de estos proteoglucanos no están constituidos de oligosacáridos idénticos, sino que exhiben diversidad estructural. Por ejemplo, una región puede contener azúcares azufrados, mientras que otra puede carecer de sulfatación. Se piensa que estas diferencias de composición dentro de una cadena de GAG influyen en las propiedades de unión de diversas regiones de estas moléculas.

Fibronectina El término "matriz" implica una estructura formada por una red de componentes interactivos. El término resulta muy adecuado para la matriz extracelular, que contiene diversas proteínas, además de colágena y proteoglucanos, que interactúan entre sí en formas muy específicas (fig. 7-5). La



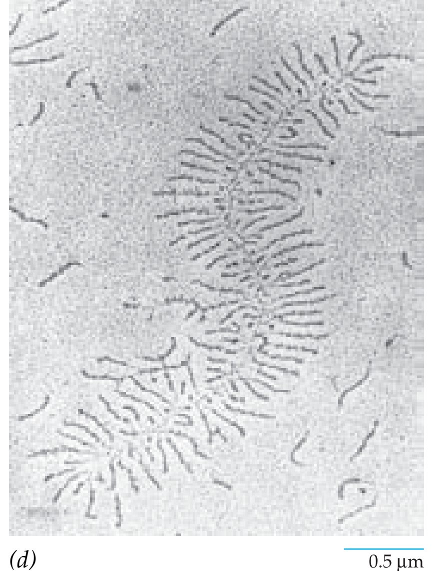
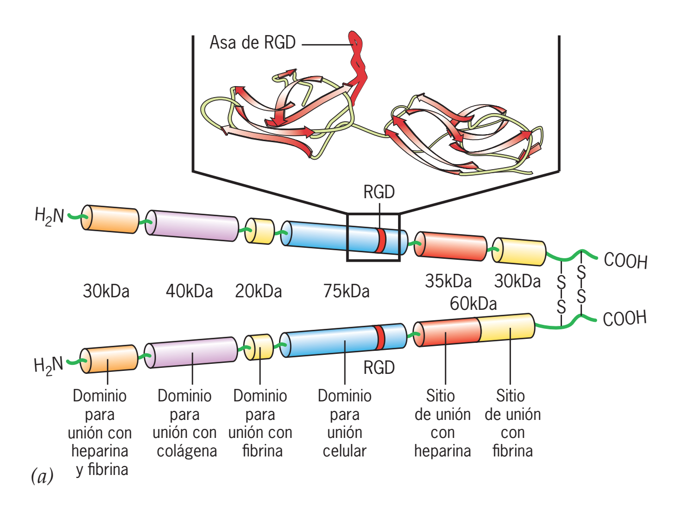


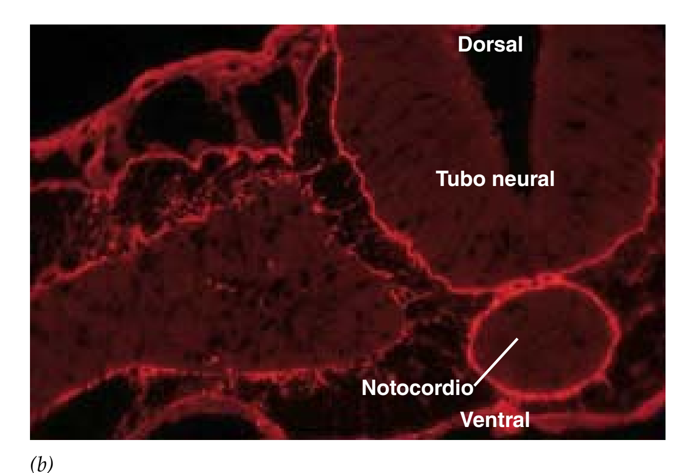
FIGURA 7-9 La estructura de un complejo de proteoglucano del tipo de cartílago. *a*) Representación esquemática de un solo proteoglucano consistente en una proteína central a la cual se unen una gran cantidad de cadenas de glucosaminoglucanos (GAG, mostrados en rojo). Un proteoglucano de la matriz del cartílago (p. ej., agrecano) puede contener cerca de 30 cadenas de sulfato de queratano y 100 de sulfato de condroitina. Los proteoglucanos que se encuentran en las membranas basales (p. ej., perlecano y agrina) tienen sólo unas cuantas cadenas de GAG unidas a la proteína central. *b*) En esta figura se muestran las estructuras de los disacáridos repetitivos que forman cada GAG. Todos los GAG poseen grandes cantidades de cargas negativas (indicadas por el sombreado azul). *c*) En la matriz del cartílago, los proteoglucanos individuales están unidos con un GAG no sulfatado llamado ácido hialurónico (o hialuronano) y forman un complejo gigante con una masa molecular cercana a 3 000 000 Da. En el recuadro se halla uno de los proteoglucanos del tipo mostrado en la parte *a*. *d*) Micrografía electrónica de un complejo de proteoglucano, comparable con el que se ilustra en la parte *c* que se aisló de la matriz del cartílago. (*D*, CORTESÍA DE LAWRENCE C. ROSENBERG.)

fibronectina, así como otras proteínas que se describen en este capítulo, consiste en un conjunto lineal de "bloques de construcción" distintos que dan a cada polipéptido una construcción modular (fig. 7-10*a*). Cada polipéptido de fibronectina se construye a partir de una secuencia de unos 30 módulos Fn plegables de manera independiente, dos de los cuales se muestran en el recuadro superior de la figura 7-10*a*. Aunque los módulos de tipo Fn se descubrieron por primera vez en la fibronectina, forman parte de muchas otras proteínas, desde los factores de coagulación sanguínea hasta receptores de membrana (véase fig. 7-22) y otras proteínas de la ECM. Como se describe en la página 59, la presencia de segmentos compartidos entre diversas proteínas sugiere que muchos genes actuales surgieron durante la evolución mediante la fusión de partes de genes ancestrales separados. En la fibronectina, los 30 módulos estructurales se combinan para formar cinco o seis dominios funcionales más grandes, ilustrados por los cilindros de color de la figura 7-10*a*. Cada una de las dos cadenas polipeptídicas que forman la molécula de fibronectina contiene lo siguiente:

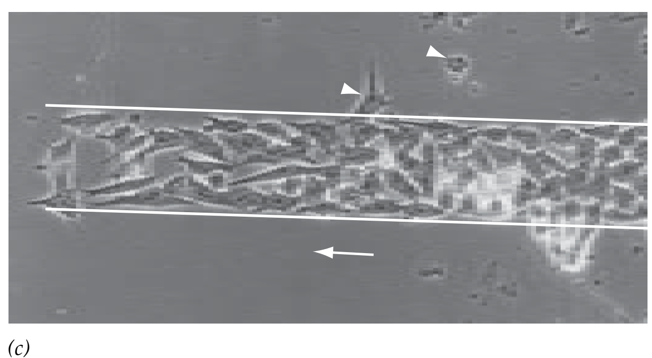
1. Sitios de unión para otros componentes de la ECM, como colágenas y proteoglucanos. Estos sitios de unión facilitan las

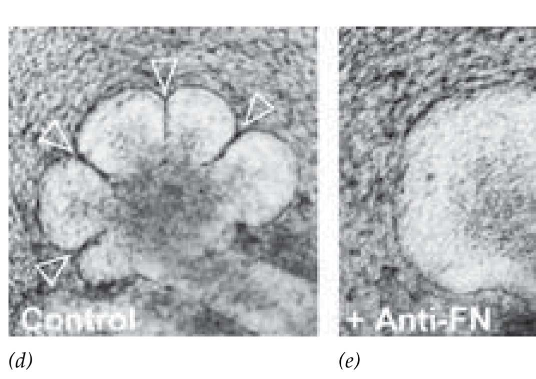


(*a*)



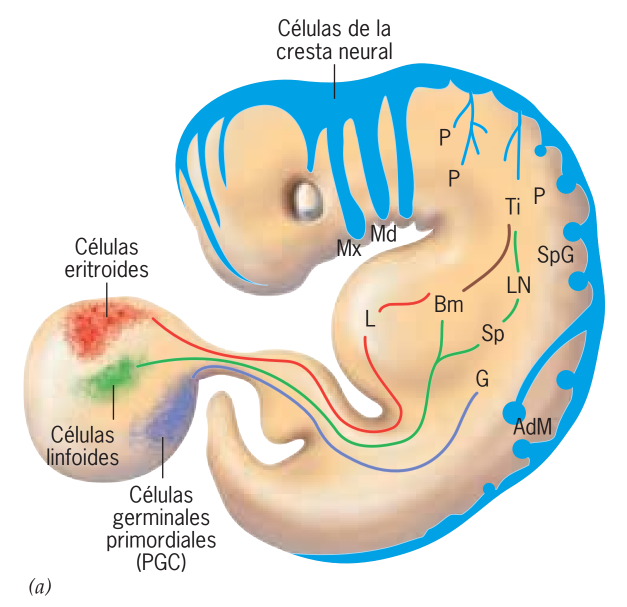
(*b*)

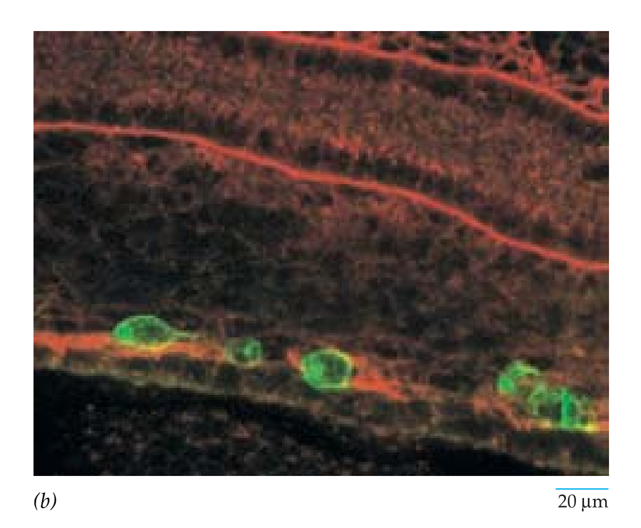

(*c*)



(*d*) (*e*)

FIGURA 7-10 Estructura de la fibronectina y su importancia durante el desarrollo embrionario. *a*) Una molécula de fibronectina humana consiste en dos polipéptidos similares, pero no idénticos, unidos por un par de enlaces disulfuro localizados cerca del extremo C. Cada polipéptido se compone de una serie lineal de módulos distintos que se organizan en varias unidades funcionales más grandes, ilustradas por los cilindros de color en esta figura. Cada una de estas unidades funcionales contiene uno o más sitios de unión para cada componente específico de la ECM o la superficie de las células. Algunas de estas actividades de unión se indican con las leyendas. Se indica el sitio de unión celular del polipéptido que contiene la secuencia arg-gli-asp, o RGD. Como se explica más adelante en este capítulo, esta secuencia se une en forma específica con una clase particular de proteínas integrales de la membrana plasmática (integrinas) que participan en la unión celular y la transducción de señales. El recuadro muestra dos de los casi 30 módulos Fn que se repiten y forman el polipéptido; la secuencia RGD forma un asa del polipéptido que sobresale de un módulo. *b*) Corte a través de un embrión joven de pollo que se trató con anticuerpos fluorescentes contra la fibronectina. Esta última está presente en la forma de fibrillas en las membranas basales (sitios de color rojo oscuro) que están debajo de los epitelios embrionarios y proporcionan un sustrato sobre el cual migran las células. *c*) En esta micrografía las células de la cresta neural emigran de una porción del sistema nervioso en desarrollo del pollo (fuera del límite de la fotografía) hacia una caja de cultivo de vidrio que contiene franjas de superficie cubiertas con fibronectina alternadas con franjas de vidrio desnudo. El límite de la región cubierta con fibronectina está indicado por las líneas blancas. Resulta evidente que las células permanecen sólo en las regiones cubiertas con fibronectina. Las células que llegan al sustrato de vidrio (puntas de flecha) tienden a redondearse y perder sus capacidades migratorias. La flecha indica la dirección de la migración. *d*, *e*) El papel de la fibronectina en la formación de la glándula salival embrionaria. La micrografía *d* muestra una glándula salival de un embrión de ratón que creció durante 10 horas en un cultivo. Se ve que la glándula se divide en yemas mediante varias hendiduras (triángulos). La glándula que se muestra en *e* se cultivó por el mismo periodo en presencia de anticuerpos contra fibronectina, lo cual impidió la formación de las hendiduras. (*B*, CORTESÍA DE JAMES W. LASH; *C*, TOMADA DE GIOVANNI LEVI, JEAN-LOUP DUBAND Y JEAN PAUL THIERY, INT REV CYTOL 123:213, 1990; *D*, *E*, REIMPRESAS DE TAKAYOSHI SAKAI, MELINDA LARSEN Y KENNETH M. YAMADA, NATURE 423:877, 2003. © 2003 MACMILLAN MAGAZINES LTD.)





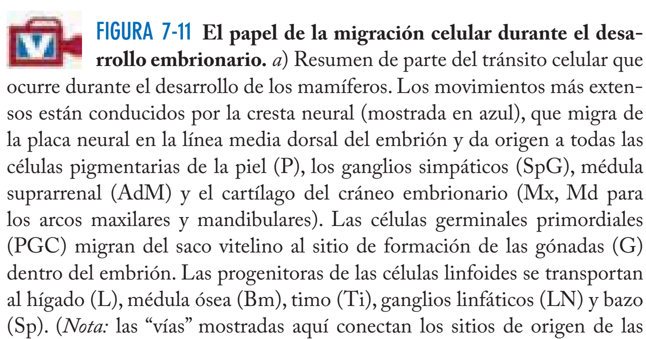


FIGURA 7-11 El papel de la migración celular durante el desarrollo embrionario. *a*) Resumen de parte del tránsito celular que ocurre durante el desarrollo de los mamíferos. Los movimientos más extensos están conducidos por la cresta neural (mostrada en azul), que migra de la placa neural en la línea media dorsal del embrión y da origen a todas las células pigmentarias de la piel (P), los ganglios simpáticos (SpG), médula suprarrenal (AdM) y el cartílago del cráneo embrionario (Mx, Md para los arcos maxilares y mandibulares). Las células germinales primordiales (PGC) migran del saco vitelino al sitio de formación de las gónadas (G) dentro del embrión. Las progenitoras de las células linfoides se transportan al hígado (L), médula ósea (Bm), timo (Ti), ganglios linfáticos (LN) y bazo (Sp). (*Nota:* las "vías" mostradas aquí conectan los sitios de origen de las células con su destino, no muestran con exactitud las rutas reales que siguen las células.) *b*) Micrografía de un corte de una porción del intestino primitivo posterior de un embrión de ratón de 10 días. Se advierte que las células germinales primordiales (verdes) migran a lo largo del mesenterio dorsal en su camino a la gónada en desarrollo. El tejido se tiñó con anticuerpos contra la proteína laminina (rojo), que se ve concentrada en la superficie sobre la cual migran las células. (*A*, TOMADA DE AARON A. MOSCONA Y R. E. HAUSMAN. IN: CELL AND TISSUE INTERACTIONS, J. W. LASH Y M. M. BURGER (EDS.), RAVEN PRESS 1977. *B*, TOMADA DE MARTIN I. GARCIA-CASTRO, ROBERT ANDERSON, JANET HEASMAN Y CHRISTOPHER WYLIE. J CELL BIOL 138:475, 1997. CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DE ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

interacciones que vinculan estas moléculas diversas en una red estable e interconectada (fig. 7-5).

2. Sitios de unión para los receptores en la superficie celular. Estos sitios de unión sostienen la ECM en unión estable con la célula (fig. 7-5). La importancia del sustrato con fibronectina para la unión celular se ilustra en la micrografía inicial del capítulo en la página 239. La célula endotelial cultivada que muestra esta fotografía adoptó una forma diferente a la que tendría en el cuerpo porque se extendió sobre la superficie disponible que le brindó una cubierta cuadrada de fibronectina.

La importancia de la fibronectina y otras proteínas extracelulares resulta muy evidente cuando los tejidos realizan actividades dinámicas, como sucede durante el desarrollo embrionario. El desarrollo se caracteriza por oleadas de migración celular durante las cuales las distintas células siguen rutas diferentes de una parte del embrión a otra (fig. 7-11*a*). Las células migrantes tienen la guía de proteínas, como la fibronectina, que están contenidas dentro del ambiente molecular por el que pasan. Por ejemplo, las células de la cresta neural, que salen del sistema nervioso en desarrollo hacia todas las partes del embrión, cruzan trayectos ricos en fibrillas compuestas por fibronectina (fig. 7-10*b*). La importancia de la fibronectina en la migración celular de la cresta neural es fácil de revelar con una caja de cultivo, como se muestra en la figura 7-10*c*. Cuando se inyectan anticuerpos que se unen con la fibronectina a los embriones, las crestas neurales ya no son capaces de interactuar con las moléculas de fibronectina en la matriz circundante y se inhibe el movimiento celular. Los anticuerpos antifibronectina pueden interrumpir otros procesos de desarrollo, como se indica en la figura 7-10*d*, *e*. Varios órganos del cuerpo, incluidos las glándulas salivales, riñones y pulmones, se forman por un proceso de ramificación en el que la capa epitelial se divide por una serie de hendiduras (fig. 7-10*d*). La importancia de la fibronectina en la formación de estas hendiduras se ilustra en la figura 7-10*e*, que muestra una glándula salival que se incubó con anticuerpos antifibronectina. La formación de hendiduras y la ramificación se eliminan por completo como resultado de la desactivación de las moléculas de fibronectina.

Laminina Las *lamininas* forman una familia de glucoproteínas extracelulares que consisten en tres cadenas polipeptídicas diferentes unidas por enlaces disulfuro y organizadas en una molécula que parece una cruz con tres brazos cortos y uno largo (fig. 7-5). Se han identificado por lo menos 15 lamininas diferentes. Al igual que la fibronectina, las lamininas extracelulares influyen en grado notorio en el potencial migratorio, crecimiento y diferenciación de las células. Por ejemplo, las lamininas tienen un papel crucial en la migración de las células germinales

primordiales (fig. 7-11*a*). Estas células están en el saco vitelino, que se localiza fuera del embrión mismo, y luego migran por la corriente sanguínea y tejidos embrionarios hasta la gónada en desarrollo, donde al final dan origen a los espermatozoides u óvulos. Durante su migración, las células germinales primordiales atraviesan superficies muy ricas en laminina (fig. 7-11*b*). Los estudios indican que las células germinales primordiales tienen una proteína superficial que se adhiere con fuerza a una de las subunidades de la molécula de laminina. En la figura 9-48*a* se ilustra la influencia de la laminina en el crecimiento de los nervios.

Además de la fuerte unión a los receptores de superficie celular, las lamininas pueden unirse a otras moléculas de laminina, proteoglucanos y otros componentes de las membranas basales (fig. 7-5). Se cree que las moléculas de laminina y colágena tipo IV forman redes separadas, pero interconectadas, como se muestra en la figura 7-12. Estas redes entrelazadas confieren fuerza y flexibilidad a las membranas basales. De hecho, las membranas basales no se forman en embriones de ratón que sean incapaces de formar laminina, lo que ocasiona la muerte embrionaria hacia el momento de la implantación.

Propiedades dinámicas Las micrografías y los diagramas presentados en la primera sección de este capítulo presentan la ECM como una estructura estática, lo cual se ajusta con el hecho de que estos materiales existen fuera de la célula viva. Sin embargo, la ECM puede mostrar en realidad propiedades dinámicas, tanto en espacio como en tiempo. Por ejemplo, desde el punto de vista espacial, las fibrillas de la ECM pueden estirarse varias veces su longitud normal cuando las células tiran de ellas y se contraen cuando se alivia la tensión. Desde el punto de vista temporal, los componentes de la ECM están sujetos a la degradación y reconstrucción continuas. Estos procesos sirven para renovar la matriz y permitir que se remodele durante el desarrollo embrionario o después de la lesión hística. Incluso la matriz calcificada de los huesos humanos, que se considera como una estructura estable e inerte, está sujeta a reparación continua.

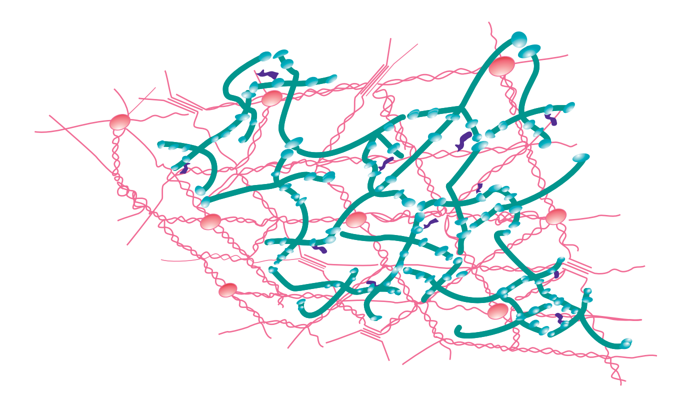


FIGURA 7-12 Modelo de la estructura de la membrana basal. Las membranas basales contienen dos moléculas formadoras de la red, la colágena IV (rosa), que se ilustra en la figura 7-8, y la laminina (verde), que se indica con las moléculas gruesas en forma de cruz. Las redes de colágena y laminina se conectan mediante moléculas de entactina (púrpura). (Tomada de Peter D. Yurchenco, Yi-Shan Cheng y Holly Colognato, J Cell Biol 117:1132, 1992. Con autorización de los derechos reservados de Rockefeller University Press.)

La degradación de materiales extracelulares, junto con las proteínas de la superficie celular, es tarea sobre todo de una familia de enzimas que contienen cinc llamadas **metaloproteinasas de la matriz (MMP)** y se secretan hacia el espacio extracelular o están fijadas a la membrana plasmática. Como grupo, las MMP pueden digerir casi todos los componentes diversos de la ECM, aunque los miembros individuales de la familia tienen un límite estrecho de moléculas extracelulares a las que pueden atacar. No se comprenden bien las funciones fisiológicas de las MMP, pero se piensa que intervienen en remodelado embrionario, migración de células embrionarias, reparación de heridas y formación de vasos sanguíneos. Como era de esperarse de enzimas cuya función normal es destruir los materiales extracelulares, es probable que la actividad excesiva o inapropiada de las MMP cause enfermedad. De hecho, las MMP intervienen en varios trastornos, como la artritis, hepatitis, ateroesclerosis, enfermedades dentales y gingivales y progresión de tumores (pág. 260).

REVISIÓN

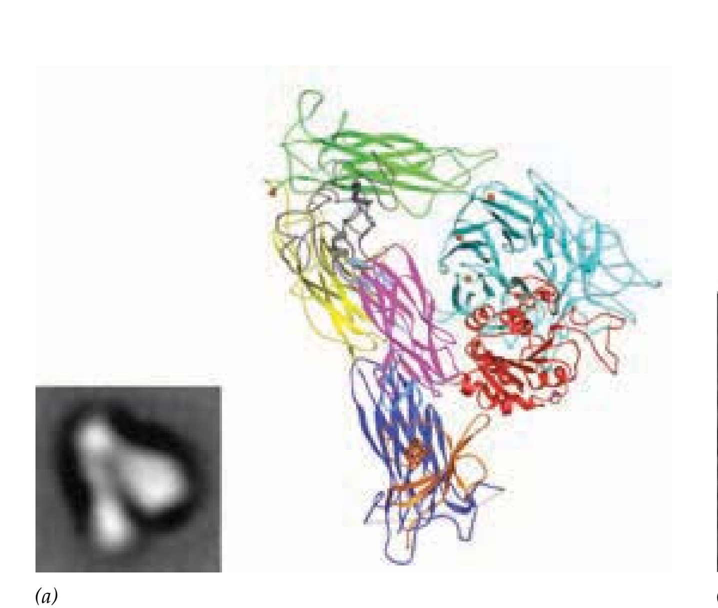
1. Distinga entre el glucocáliz, una membrana basal y la matriz extracelular del tejido cartilaginoso.
2. Contraste los papeles de la colágena y los proteoglucanos en el espacio extracelular. ¿Cómo contribuyen la fibronectina y la laminina al desarrollo embrionario?
3. Mencione unas cuantas de las funciones de la matriz extracelular en los tejidos animales.

7.2 INTERACCIONES DE LAS CÉLULAS CON LOS MATERIALES EXTRACELULARES

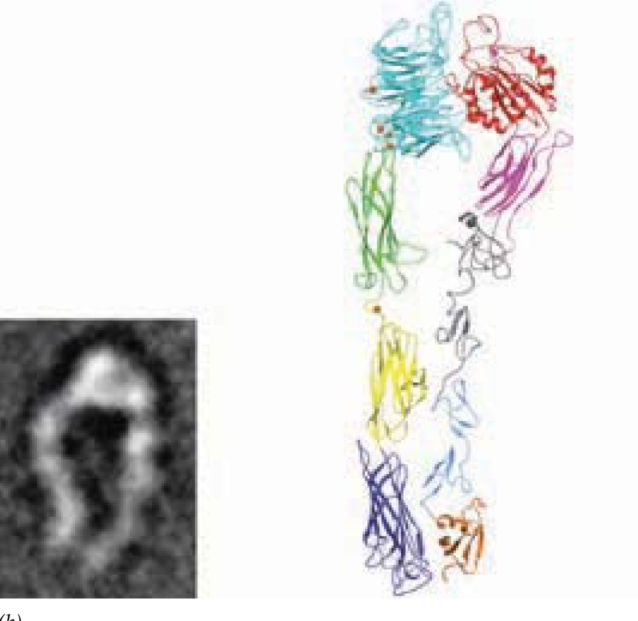
En la explicación previa se indicó que los componentes de la ECM, como la fibronectina, laminina, proteoglucanos y colágena, son capaces de unirse con receptores situados en la superficie celular (como en la figura 7-5). La familia más importante de receptores que adhiere las células a su microambiente extracelular son las integrinas.

Integrinas

Las **integrinas** son una familia de proteínas integrales de membrana que sólo se encuentran en animales y se unen con sustancias específicas (ligandos) en el ambiente extracelular. Las integrinas están formadas por dos cadenas polipeptídicas que cruzan la membrana, una cadena alfa y una beta, que se unen con enlaces covalentes. Se han identificado 18 subunidades alfa y ocho subunidades beta diferentes. Aunque en teoría podrían formarse más de 100 parejas posibles de subunidades alfa y beta, sólo se han reconocido cerca de dos docenas de integrinas diferentes en las superficies celulares, cada una con una distribución específica en el cuerpo. La mayoría de las células tiene diversas integrinas distintas y, por el contrario, la mayor parte de las integrinas se halla en varios tipos celulares diferentes.



(a)



(b)

FIGURA 7-13 Conformaciones de la integrina. *a*) Representación de un listón que representa los dominios extracelulares de una integrina ($\alpha_v\beta_3$) en su conformación "doblada", según lo revela la cristalografía por rayos X, y micrografía electrónica correspondiente de la misma porción de una molécula de integrina. Los estudios sugieren que ésta es una conformación inactiva de la integrina. *b*) Esquema en listón y micrografía electrónica de la misma integrina en la conformación "vertical", que al parecer representa a la estructura activa (es decir, para unión con ligando). Los iones metálicos divalentes (Ca^{2+}, Mg^{2+} y/o Mn^{2+}) se muestran como esferas naranja. (MICROGRAFÍAS ELECTRÓNICAS DE JUNICHI TAKAGI, ET AL., CELL 110:601, 2002; CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS. ESQUEMAS DE LISTÓN TOMADOS DE M. AMIN ARNAOUT, ET AL., CURR OPIN CELL BIOL 14:643, 2002.)

Las observaciones con microscopio electrónico de las moléculas de integrina iniciaron a finales del decenio de 1980 y sugirieron que las dos subunidades están orientadas de tal manera que forman una cabeza globular extracelular conectada con la membrana mediante un par de "piernas" alargadas (como se muestra en la figura 7-5). Las piernas de cada subunidad se extienden por la bicapa de lípidos como una sola hélice transmembranosa y terminan en un pequeño dominio citoplásmico de unos 20 a 70 aminoácidos.[1] Cada integrina puede unirse con varios cationes divalentes, incluidos Ca^{2+}, Mg^{2+} y Mn^{2+}, aunque aún no se conoce el efecto de cada ion en la estructura y las capacidades de unión con ligando de la proteína. La primera estructura cristalográfica por rayos X de la porción extracelular de una integrina se publicó en 2001 y mostró un rasgo muy inesperado. En lugar de "permanecer vertical" como se predijo, la integrina $\alpha_v\beta_3$ se doblaba en forma notable al nivel de las "rodillas", de tal manera que la cabeza quedaba de frente a la superficie externa de la membrana plasmática (fig. 7-13*a*). Para comprender el significado de esta estructura doblada, es necesario explorar las propiedades de las integrinas.

Muchas integrinas, incluida la que aparece en la figura 7-13, sólo pueden existir en la superficie de una célula en su conformación inactiva. Dichas integrinas pueden activarse rápidamente por fenómenos dentro de la célula que alteran la conformación de los dominios citoplásmicos de las subunidades de las integrinas. Los cambios en la conformación de los dominios citoplásmicos se propagan por la molécula, lo que aumenta la afinidad de la integrina por un ligando extracelular. Por ejemplo, la agregación de plaquetas durante la coagulación sanguínea (véase fig. 7-15) ocurre sólo después de la activación citoplásmica de las integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$, lo cual incrementa su afinidad por el fibrinógeno. Este tipo de alteración de la afinidad de la integrina desencadenada por cambios que suceden dentro de la célula se conoce como señalización "de adentro hacia afuera". En ausencia de esta señal, la integrina permanece en estado inactivo, lo cual protege al cuerpo contra la formación de un coágulo sanguíneo inapropiado.

Cada vez hay más evidencia que sugiere que la conformación flexionada de la integrina que se muestra en la figura 7-13*a* corresponde al estado inactivo de la proteína, incapaz de unirse con un ligando. De hecho, cuando se analiza una integrina $\alpha_v\beta_3$ que tiene un ligando unido, la integrina ya no posee la estructura doblada, sino que tiene una conformación vertical, como se ilustra en la figura 7-13*b*. El ligando se une con la cabeza de la integrina en una región en la que las subunidades alfa y beta se unen (como en la figura 7-14). Si las estructuras flexionada y vertical representan los estados inactivo y activo de una integrina, respectivamente, entonces es importante considerar qué tipo de estímulo es capaz de inducir una transformación tan notable en la conformación de la proteína.

Los estudios sugieren que la capacidad para unirse a ligando que tienen los dominios extracelulares de una integrina

[1] Una excepción a esta configuración molecular es la cadena β_4, que tiene alrededor de un millar de aminoácidos más como parte de su dominio citoplásmico. Esta enorme adición hace que las integrinas β_4 sean capaces de extenderse a una profundidad mucho mayor en el citoplasma (véase fig. 7-19).

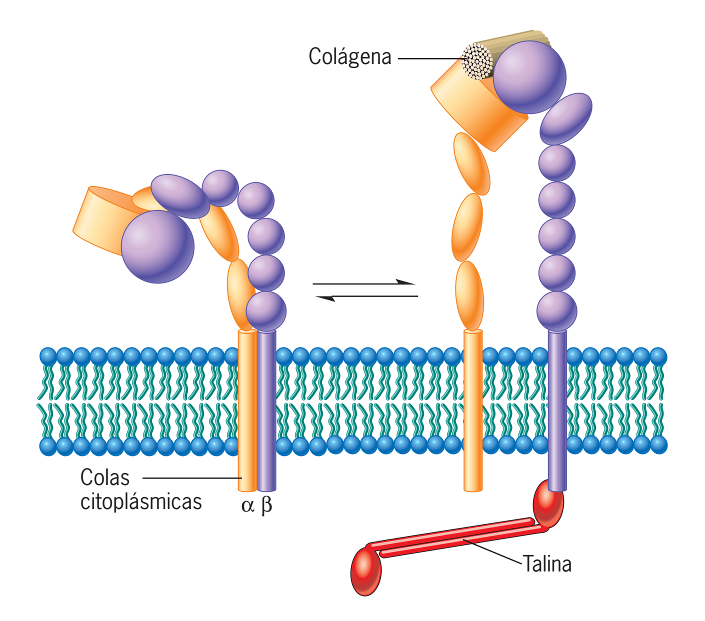


FIGURA 7-14 Un modelo de la activación de la integrina. Representación esquemática de una molécula heterodimérica de integrina en la conformación doblada inactiva (izquierda) y la conformación vertical activa (derecha). El cambio de la conformación se inicia por la unión de una proteína, en este caso la talina, con el pequeño dominio citoplásmico de la subunidad beta. La unión de la talina induce una separación de las dos subunidades y la conversión a la conformación activa. Las integrinas activadas típicamente se agregan como resultado de interacciones en sus dominios citoplásmicos con el citoesqueleto subyacente, como se indica en la figura 7-17*c*. La estructura del dominio de cada subunidad que se ve en los dibujos de listón de la figura 7-13 se muestra aquí con segmentos de forma redondeada. El ligando extracelular, en este caso una fibra de colágena, se une entre las dos subunidades en la región de la cabeza del dímero de integrina activado.

depende de la disposición espacial de las colas citoplásmicas α y β presentes en el lado interno de la membrana. Los dominios citoplásmicos de las integrinas se unen a una gran variedad de proteínas; una de éstas, llamada talina, causa la separación de las subunidades α y β (fig. 7-14). Las mutaciones en la talina que bloquean su interacción con subunidades de integrina β también impiden la activación de las integrinas y la adhesión a la ECM. Se piensa que la separación de los extremos citoplásmicos de las integrinas por talina induce un cambio en la conformación de las piernas de la integrina, lo que hace que la molécula asuma la posición vertical en que la cabeza de la proteína es capaz de interactuar de manera específica con su ligando apropiado.[2]

Un incremento en la afinidad de integrinas individuales a menudo va seguido de agregación de las integrinas activadas, lo que incrementa en gran medida la fuerza total de la interacción de la superficie celular y sus ligandos extracelulares.

Las integrinas participan en dos tipos principales de actividades: adhesión de las células con el sustrato (o con otras células) y la transmisión de señales del ambiente exterior al interior de la célula, fenómeno que se conoce como señalización de "afuera-adentro". La unión del dominio extracelular de una integrina con el ligando, como la fibronectina o la colágena, induce un cambio en la conformación en el extremo citoplásmico de la integrina. A su vez, algunos cambios en el extremo citoplásmico alteran el modo en que la integrina interactúa con proteínas citoplásmicas cercanas, modificando su actividad. Así, cuando las integrinas se unen a un ligando extracelular, pueden inducir la activación de cinasas de proteína citoplásmicas, como FAK y Src (véase fig. 7-17*c*). Entonces estas cinasas pueden fosforilar otras proteínas, iniciando una reacción en cadena. En algunos casos, la reacción en cadena llega hasta el núcleo, donde puede activarse un grupo específico de genes.

Las señales de afuera-adentro transmitidas por las integrinas (y por otras moléculas de la superficie celular) influyen en muchos aspectos del comportamiento celular, como la diferenciación, motilidad, crecimiento e incluso la supervivencia de la célula. La influencia de las integrinas en la supervivencia celular se ilustra mejor si se comparan las células benignas con las malignas. Casi todas las células malignas pueden crecer mientras están suspendidas en un medio de cultivo líquido. Sin embargo, las células normales sólo pueden crecer y dividirse si se cultivan en un sustrato sólido; mueren cuando se colocan en cultivos de suspensión. Se cree que las células normales mueren cuando se cultivan en suspensión porque sus integrinas no pueden interactuar con los sustratos extracelulares y, como resultado, no pueden transmitir señales que salven la vida dentro de la célula. Cuando las células se vuelven malignas, su supervivencia ya no depende de la unión de la integrina. El papel de las integrinas en la transmisión de señales es una de las áreas más activas de investigación en la biología celular y se explora con más detalle en la página 262.

El cuadro 7-1 lista varias integrinas conocidas y los ligandos extracelulares clave con los que se unen. El vínculo entre las integrinas y estos ligandos media la adhesión entre las células y su ambiente. Como las células individuales pueden expresar diversas integrinas diferentes en su superficie, estas células son

[2] Varios estudios estructurales (p. ej., *J. Cell Biol.* 168:501 y 1109, 2005) han indicado que la integrina *bent* modificada puede unirse a determinados tipos de ligandos. Esta forma modificada de la conformación flexionada podría representar una etapa intermedia de la activación de integrina.

capaces de unirse con distintos componentes extracelulares (fig. 7-5). A pesar de la superposición aparente, la mayoría de las integrinas parece tener funciones únicas, ya que los ratones manipulados genéticamente (sección 18.18) que carecen de diferentes subunidades de integrinas tienen fenotipos diversos. Por ejemplo, los ratones en los que se eliminó la subunidad α_8 poseen defectos renales, aquellos sin α_4 padecen defectos cardiacos y los que carecen de α_5 presentan defectos vasculares.

Muchas de las proteínas extracelulares que se unen con las integrinas lo hacen porque contienen la secuencia de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (o en la nomenclatura abreviada de los aminoácidos, RGD). Este tripéptido está presente en los sitios de unión celular de los proteoglucanos, fibronectina, laminina y varias proteínas extracelulares más. El dominio de unión celular de la fibronectina, con su asa extendida que contiene RGD, se muestra en la figura 7-10*a*.

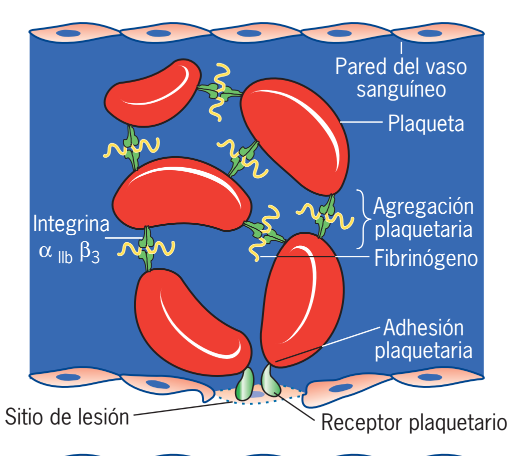
El descubrimiento de la importancia de la secuencia RGD abrió la puerta a nuevos caminos para el tratamiento de trastornos que afectan las interacciones entre receptor y ligando. Cuando se lesiona la pared de un vaso sanguíneo, la región dañada se sella mediante la agregación controlada de plaquetas sanguíneas, células anucleadas que circulan en la sangre. Cuando ello ocurre en un momento o un lugar inapropiado, la agregación de las plaquetas puede formar un coágulo sanguíneo potencialmente peligroso (*trombo*) capaz de bloquear el flujo de sangre hacia órganos importantes y es una de las causas principales de ataque cardiaco y accidente vascular cerebral. La agregación de las plaquetas requiere la interacción de una integrina específica de estas células ($\alpha_{IIb}\beta_3$) con las proteínas sanguíneas solubles que contienen RGD, como el fibrinógeno y el factor de von Willebrand, que actúan como conectores que mantienen unidas a las plaquetas (fig. 7-15, parte superior). Los experimentos con animales indican que los péptidos que contienen RGD pueden inhibir la formación del coágulo sanguíneo porque impiden que la integrina plaquetaria se una con las proteínas sanguíneas (fig. 7-15, parte inferior). Estos hallazgos condujeron al diseño de una nueva clase de agentes antitrombóticos (tirofibán y eptifibátido) con estructura similar a RGD, pero que se unen en forma selectiva a la integrina plaquetaria. Un anticuerpo específico (ReoPro) dirigido contra el sitio de unión RGD de las integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ también puede prevenir la formación de coágulos sanguíneos en ciertos pacientes que se someten a operaciones vasculares de alto riesgo. En la actualidad, se realizan pruebas clínicas con varios compuestos dirigidos a las integrinas que participan en otras enfermedades.

Los dominios citoplásmicos de las integrinas contienen sitios de unión para diversas proteínas citoplásmicas, incluidas varias que funcionan como adaptadores que unen la integrina con filamentos de actina del citoesqueleto (véase fig. 7-17). El papel de las integrinas en el establecimiento de la conexión de la ECM y el citoesqueleto se ve mejor en dos estructuras especializadas: adhesiones focales y hemidesmosomas.

Cuadro 7-1 Clasificación de receptores de integrina con base en el reconocimiento de las secuencias RGD

Reconocimiento de RGD		Reconocimiento de no RGD	
Receptor de integrina	Ligandos clave	Receptor de integrina	Ligandos clave
$\alpha_3\beta_1$	Fibronectina	$\alpha_1\beta_1$	Colágena
$\alpha_5\beta_1$	Fibronectina	$\alpha_2\beta_1$	Colágena
$\alpha_v\beta_1$	Fibronectina		Laminina
		$\alpha_3\beta_1$	Colágena
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibronectina		Laminina
	Factor de von Willebrand	$\alpha_4\beta_1$	Fibronectina
	Vitronectina		VCAM
	Fibrinógeno	$\alpha_6\beta_1$	Laminina
$\alpha_v\beta_3$	Fibronectina	$\alpha_L\beta_2$	ICAM-1
	Factor de von Willebrand		ICAM-2
	Vitronectina	$\alpha_M\beta_2$	Fibrinógeno
$\alpha_v\beta_5$	Vitronectina		ICAM-1
$\alpha_v\beta_6$	Fibronectina		

Fuente: S. E. D'Souza, M. H. Ginsberg y E. F. Plow. *Trends Biochem Sci* 16:249, 1991.



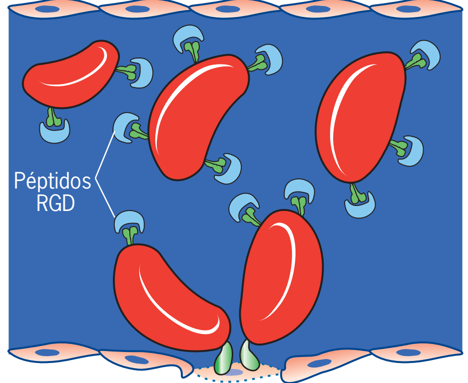
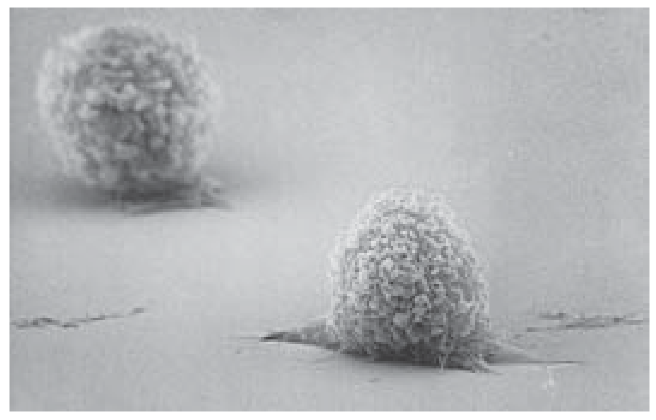
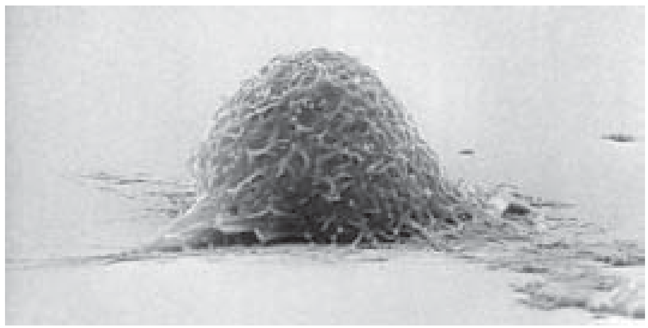
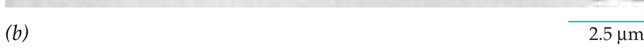


FIGURA 7-15 Se forman coágulos sanguíneos cuando las plaquetas se adhieren entre sí mediante puentes de fibrinógeno que se unen con las integrinas plaquetarias. La presencia de péptidos RGD sintéticos puede inhibir la formación de un coágulo sanguíneo por competencia con las moléculas de fibrinógeno por los sitios de unión RGD en las integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ (también denominadas GPIIb/IIIa). Los análogos no peptídicos de RGD y los anticuerpos contra integrina pueden actuar de la misma manera para impedir la formación de coágulos en personas de alto riesgo.

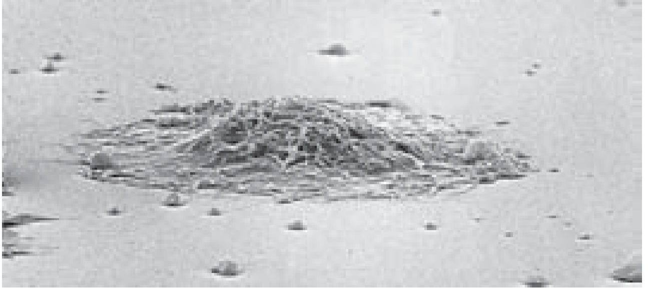


(a) 2.5 µm





(b) 2.5 µm



(c) 2.5 µm

(d) 2.5 µm

FIGURA 7-16 Pasos en el proceso de diseminación celular. Micrografías electrónicas de barrido que muestran la morfología de los fibroblastos de ratón en momentos sucesivos durante la unión y diseminación sobre cubreobjetos de vidrio. Las células se fijaron después de 30 minutos (*a*), 60 minutos (*b*), dos horas (*c*) y 24 horas (*d*) tras la unión. (TOMADA DE J. J. ROSEN Y L. A. CULP. EXP CELL RES 107:141, 1977.)

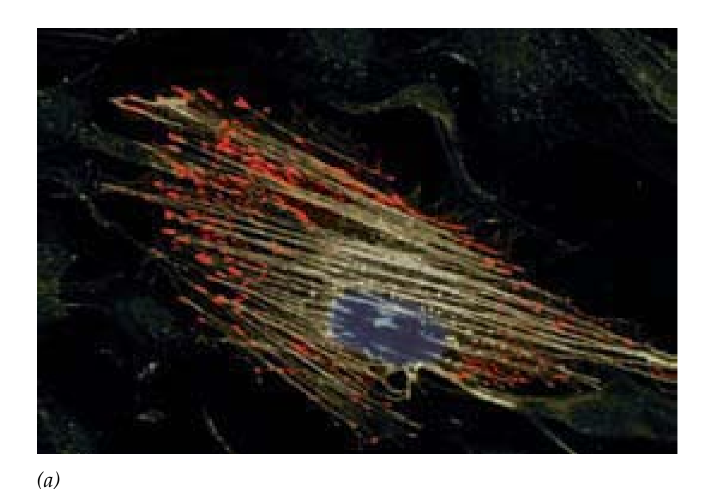
Adhesiones focales y hemidesmosomas: fijación de las células a su sustrato

Es mucho más fácil estudiar la interacción de las células en una caja de cultivo que con la matriz extracelular dentro de un animal. Por consiguiente, gran parte del conocimiento actual sobre las interacciones entre la célula y la matriz se obtuvo del estudio de células adheridas a varios sustratos in vitro. Las etapas en la unión de una célula con la superficie de un recipiente de cultivo se muestran en la figura 7-16. Al principio, la célula tiene una forma redondeada, esto casi siempre sucede con células animales suspendidas en un medio acuoso. Una vez que la célula hace contacto con el sustrato, emite proyecciones que forman uniones cada vez más estables. Con el tiempo, la célula se aplana y se extiende sobre el sustrato.

Cuando los fibroblastos o células epiteliales se extienden sobre el fondo de una caja de cultivo, la superficie inferior de la célula no se presiona de manera uniforme contra el sustrato. En lugar de ello, la célula se fija a la superficie de la caja sólo en sitios dispersos y discretos; esto se conoce como **adhesiones focales** (fig. 7-17*a*). Las adhesiones focales son estructuras dinámicas que pueden romperse con facilidad si se estimula la célula adherida para moverse o entrar en mitosis. La membrana plasmática de la región de una adhesión focal contiene grandes cúmulos de integrinas, con frecuencia $\alpha_v\beta_3$, la integrina cuya estructura se muestra en la figura 7-13. Los dominios citoplásmicos de las integrinas se conectan mediante varios adaptadores a los filamentos de actina del citoesqueleto (fig. 7-17*b, c*). La figura 7-17*c* también ilustra cómo la unión de un ligando extracelular, como la fibronectina o la laminina, puede activar las cinasas de proteína, como FAK o Src, que pueden transmitir señales por toda la célula, incluido el núcleo.

Las adhesiones focales también se refirieron en la adhesión y locomoción celulares, aunque el papel preciso de estas estructuras ha sido tema de debate. Al margen de esto, las adhesiones focales son capaces de crear o responder a fuerzas mecánicas, lo cual era de esperar de una estructura que contiene actina y miosina, dos de las principales proteínas contráctiles de la célula. La figura 7-18 muestra un fibroblasto cultivado unido a una superficie cuajada que puede deformarse por fuerzas locales. La superficie original contenía un patrón de rejilla uniforme que se distorsionó por las fuerzas de tracción (sujeción-tracción) generadas por las adhesiones focales en la superficie inferior de la célula. A la inversa, las fuerzas mecánicas aplicadas a las superficies de las células pueden ser convertidas en señales citoplásmicas por adhesiones focales. Por ejemplo, en un estudio se permitió que determinadas células se unieran a cuentas que habían sido cubiertas con una capa de fibronectina. Cuando las cuentas cubiertas por membrana fueron tomadas por pinzas ópticas (pág. 142), el estímulo mecánico se transmitió al interior de la célula, donde generó una onda de activación de cinasa de Src. Dentro del cuerpo, la activación de proteincinasas puede modificar en grado impresionante el comportamiento celular, incluida la transformación de células al estado canceroso (lo que se considera en la sección Vías experimentales del capítulo 16).

Las adhesiones focales se encuentran con mayor frecuencia en las células que crecen in vitro, aunque existen tipos similares de contactos adhesivos en ciertos tejidos, como el músculo y el tendón. Dentro del cuerpo, la unión más fuerte entre una célula y su matriz extracelular se halla en la superficie basal de



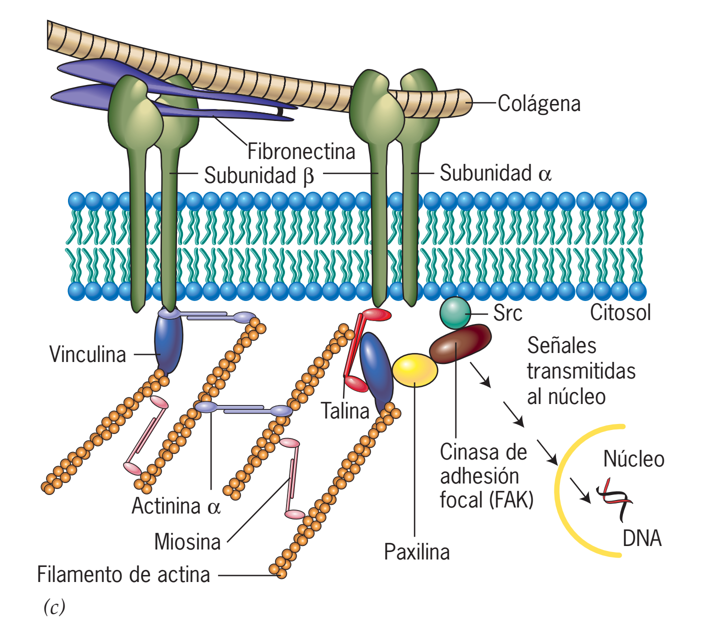
(a)

Filamentos de actina

Unión de membrana

(b)

2.5 μm



(c)

FIGURA 7-17 Las adhesiones focales son sitios en los que las células se adhieren al sustrato. *a*) Esta célula cultivada se tiñó con anticuerpos fluorescentes para revelar las localizaciones de los filamentos de actina (verde-gris) y las integrinas (rojo). Las integrinas se localizan en pequeños parches que corresponden a los sitios de las adhesiones focales. *b*) Se muestra la superficie citoplásmica de una adhesión focal de una célula cultivada de anfibio después de procesar la superficie interna de la membrana para su análisis por congelamiento rápido y grabado profundo. Se identifican los haces de microfibras que se relacionan con la superficie interna de la membrana en la región de una adhesión focal. *c*) Esquema de una adhesión focal que muestra las interacciones de las moléculas de integrina con otras proteínas en ambos lados de la bicapa de lípidos. Se cree que la unión de ligandos extracelulares, como la colágena y la fibronectina, induce cambios en la conformación de los dominios citoplásmicos de la integrina que hacen que las integrinas se unan con los filamentos de actina del citoesqueleto. A su vez, los enlaces con el citoesqueleto inducen la aglomeración de integrinas en la superficie celular. Los enlaces con el citoesqueleto están mediados por varias proteínas de unión con la actina, como la talina y la actinina alfa, que se unen con la subunidad beta de la integrina. Los dominios citoplásmicos de las integrinas también se relacionan con las cinasas de proteína, como la cinasa de adhesión focal (FAK). La unión de la integrina con un ligando extracelular puede activar estas cinasas de proteína e iniciar una reacción en cadena que transmite señales por toda la célula. La relación de las moléculas de miosina con los filamentos de actina puede generar fuerzas de tracción que se transmiten a sitios de unión entre la célula y el sustrato. (*A*, TOMADA DE MARGO LAKONISHOK Y CHRIS DOE, SCI AM PÁG. 68, MAYO DE 1997; *B*, TOMADA DE STEVEN J. SAMUELSSON, PAUL J. LUTHER, DAVID W. PUMPLIN Y ROBERT J. BLOCH. J CELL BIOL 122:487, 1993. CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

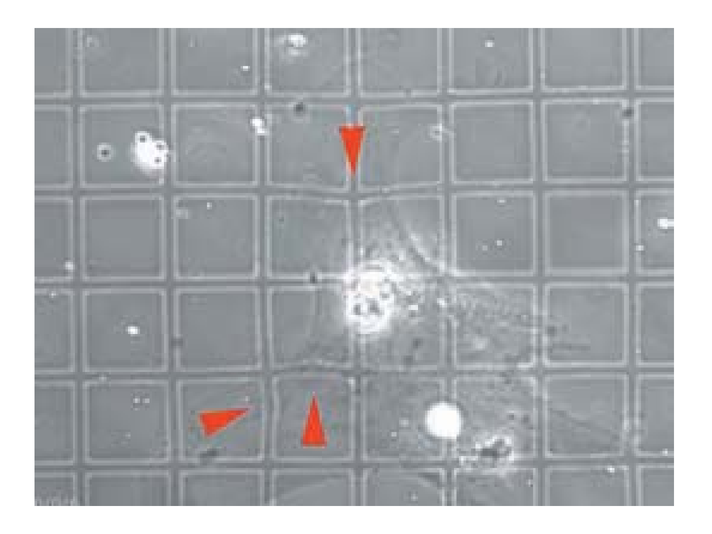
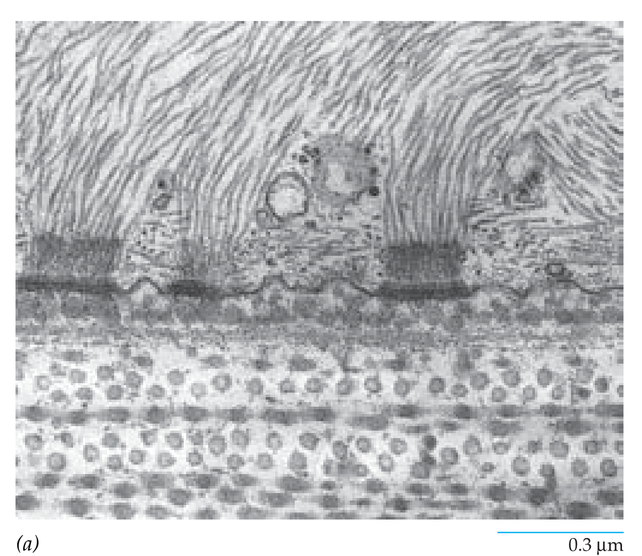


FIGURA 7-18 Demostración experimental de las fuerzas ejercidas por las adhesiones focales. En esta técnica, los fibroblastos se platinan sobre una superficie deformable que contiene un patrón de rejilla uniforme visible. Las fuerzas de tracción generadas por las adhesiones focales pueden vigilarse al observar las deformaciones (puntas de flecha) en el patrón de rejilla del sustrato al cual se adhieren las células. La generación de fuerza puede relacionarse con la localización de las adhesiones focales con marca fluorescente (no se muestra). (REIMPRESA A PARTIR DE N. Q. BALABAN, ET AL., NATURE CELL BIOL 3:468, 2001; CORTESÍA DE BENJAMIN GEIGER. © 2001, MACMILLAN MAGAZINES LTD.)

las células epiteliales, en los puntos donde las células se fijan a la membrana basal subyacente mediante una estructura adhesiva especializada llamada **hemidesmosoma** (figs. 7-1 y 7-19). Los hemidesmosomas contienen una placa densa en la superficie interna de la membrana plasmática con filamentos que salen hacia el citoplasma. A diferencia de los filamentos de las adhesiones focales que se forman con actina, los filamentos de los hemidesmosomas son más gruesos y están formados por la proteína queratina. Los filamentos que contienen queratina se clasifican como filamentos intermedios, que ejercen sobre todo una función de soporte (como se explica con detalle en la sección 9.4). Los filamentos de queratina del hemidesmosoma se unen con la matriz extracelular mediante integrinas que cruzan toda la membrana, incluida la $\alpha_6\beta_4$ (fig. 7-19*b*). Al igual que sus contrapartes en las adhesiones focales, estas integrinas también transmiten señales desde la ECM que influyen en la forma y actividades de las células epiteliales unidas.

La importancia de los hemidesmosomas se demuestra en una enfermedad rara, el *penfigoide ampolloso*, en la que los individuos producen anticuerpos que se unen con las proteínas (los *antígenos del penfigoide ampolloso*) presentes en estas estructuras adhesivas. Las anormalidades causadas por la producción de anticuerpos dirigidos contra los propios tejidos (autoanticuerpos) se llaman trastornos autoinmunitarios y son el origen de una gran variedad de alteraciones. En este caso, la presencia de autoanticuerpos hace que la capa inferior de la epidermis pierda su adhesión con la membrana basal (y por tanto de la capa de tejido conjuntivo de la dermis). La fuga de líquido hacia el espacio por debajo de la epidermis da origen a la formación grave de vesículas en la piel. Una enfermedad hereditaria vesicante similar, la *epidermólisis ampollosa*, puede ocurrir en pacientes con anomalías genéticas en cualesquiera de las proteínas de los hemidesmosomas, incluidas las subunidades α_6 o β_4 de integrina, la colágena VII o la laminina 5.



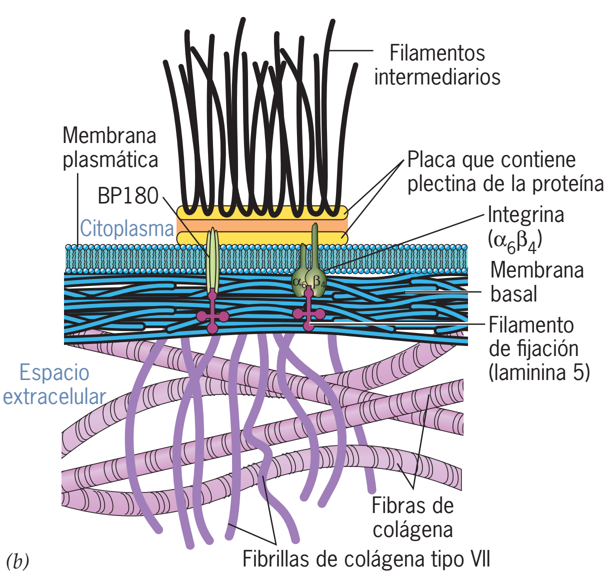


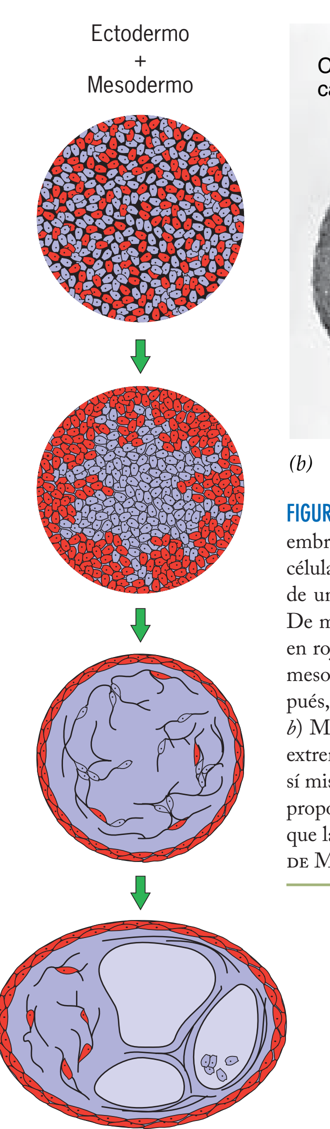
FIGURA 7-19 Los hemidesmosomas son sitios diferenciados en las superficies basales de las células epiteliales en los que las células se unen con la membrana basal subyacente. *a*) Micrografía electrónica de varios hemidesmosomas que muestra la placa densa en la superficie interna de la membrana plasmática y los filamentos intermedios que se proyectan hacia el citoplasma. *b*) Esquema que representa los principales componentes de un hemidesmosoma que conecta la epidermis con la dermis subyacente. Las moléculas de integrina $\alpha_6\beta_4$ de las células epidérmicas se unen con los filamentos intermedios citoplásmicos mediante una proteína llamada plectina, que está presente en la placa con tinción oscura, y a la membrana basal mediante filamentos de fijación de un tipo particular de laminina. Los hemidesmosomas poseen una segunda proteína transmembranosa (BP180). Las fibras de colágena son parte de la dermis subyacente. (*A*, TOMADA DE DOUGLAS E. KELLY, J CELL BIOL 28:51, 1966. CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DE ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

REVISIÓN ?

1. ¿Cómo es que las integrinas pueden unir la superficie celular con materiales que constituyen la ECM?, ¿en qué difieren las estructuras activas e inactivas de las integrinas entre sí, tanto en estructura como en función?, ¿cuál es la importancia de la presencia de un fragmento RGD en un ligando para integrina?
2. ¿Cómo participa una proteína de la superficie celular en la adhesión celular y la transducción de señales transmembranosas?
3. ¿Cuál es la diferencia entre la señalización de adentro-afuera y de afuera-adentro?, ¿cuál es la importancia de cada una para las actividades celulares?
4. Mencione dos características que distingan a los hemidesmosomas de las adhesiones focales.

7.3 INTERACCIONES DE LAS CÉLULAS ENTRE SÍ

El examen de un corte delgado a través de un órgano mayor de algún animal revela una configuración compleja que incluye diversos tipos diferentes de células. Es poco lo que se sabe de los mecanismos que permiten generar las disposiciones celulares tridimensionales complejas que se encuentran en los órganos en desarrollo. Se presume que este proceso depende en buena medida de las interacciones *selectivas* entre células del



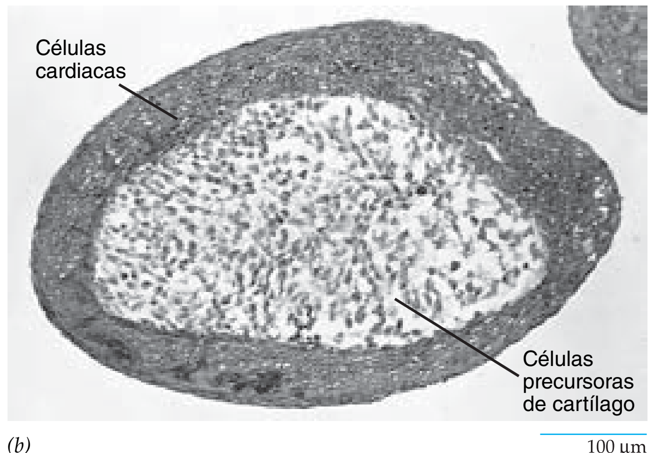


FIGURA 7-20 Demostración experimental del reconocimiento entre células. Cuando las células de diferentes partes del embrión se disocian y luego se mezclan, las células se agregan al principio y luego se clasifican al relacionarse con otras células del mismo tipo. Aquí se muestran los resultados de dos de estos experimentos. *a*) En este experimento dos regiones de un embrión de anfibio joven (el ectodermo y el mesodermo) se separaron en células individuales y se combinaron. De manera inicial, las células forman un agregado mixto, pero al final se clasifican. Las células ectodérmicas (mostradas en rojo) se mueven hacia la superficie externa del agregado, que es donde debería localizarse en el embrión, y las células mesodérmicas (mostradas en púrpura) se desplazan hacia el interior, la posición que deberían ocupar en el embrión. Después, ambos tipos de células se diferencian en los tipos de estructuras a las que darían origen en circunstancias normales. *b*) Micrografía óptica que muestra los resultados de un experimento en el que las células precursoras de cartílago de la extremidad de un pollo se mezclan con células del ventrículo cardiaco del pollo. Los dos tipos de células se separaron por sí mismas del agregado mixto y las células cardiacas forman una capa fuera de las células que darían origen a cartílago. Se propone que las células precartilaginosas se reúnen en el centro del agregado porque se adhieren entre sí más fuertemente que las células cardiacas. (*A*, TOMADA DE P. L. TOWNES Y JOHANNES HOLTFRETER. J EXP ZOOL 128:53, 1955; *B*, TOMADA DE MALCOLM S. STEINBERG. J EXP ZOOL 173:411, 1970.)

mismo tipo, así como entre células de tipos diferentes. Las pruebas indican que las células son capaces de reconocer las superficies de otras células, por lo que interactúan con unas y pasan por alto a otras.

Es muy difícil estudiar las interacciones celulares que ocurren dentro de los diminutos órganos de un embrión en desarrollo. Para los intentos iniciales de comprender el reconocimiento y la adhesión entre células se extrajo un órgano en desarrollo de un embrión de pollo o un anfibio, con objeto de disociar los tejidos del órgano y obtener una suspensión de células individuales; luego se identificó la capacidad de las células para reagregarse en cultivo. En experimentos donde se disociaron células de dos órganos diferentes en desarrollo y se mezclaron, al principio las células se agregaban para formar un cúmulo mixto. Sin embargo, con el tiempo las células se movían dentro del agregado y al final se "seleccionaban" de manera que cada célula se adhería sólo con células de su mismo tipo (fig. 7-20). Una vez separadas en un cúmulo homogéneo, estas células embrionarias se diferenciaban a menudo en muchas de las estructuras que habrían formado en el embrión intacto.

Se sabía poco acerca de la naturaleza de las moléculas que median la adhesión intercelular hasta que se desarrollaron las técnicas para purificar las proteínas integrales de membrana y, en fecha más reciente, para el aislamiento y clonación de genes que codifican estas proteínas. Ahora ya se han reconocido docenas de proteínas diferentes que participan en la adhesión celular. Se cree que las disposiciones distintas de estas moléculas en las superficies de tipos diferentes de células son la causa de las interacciones específicas entre las células dentro de tejidos complejos. Cuatro familias distintas de proteínas integrales de membrana tienen un papel crucial en la mediación de la adhesión intercelular: a) selectinas, b) ciertos miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF), c) algunos miembros de la familia de las integrinas y d) las caderinas.

Selectinas

Durante el decenio de 1960 se descubrió que los linfocitos retirados de los ganglios linfáticos periféricos, marcados con una sustancia radiactiva e inyectados de nueva cuenta al cuerpo regresaban a los sitios de donde provenían, un fenómeno que se denominó "regreso de los linfocitos a casa". Más tarde se encontró que esta vuelta al origen podía estudiarse in vitro si se permitía a los linfocitos adherirse a cortes congelados de órganos linfoides. En estas condiciones experimentales, los linfocitos podrían adherirse de manera selectiva al recubrimiento endotelial de las vénulas (las venas más pequeñas) de los ganglios linfáticos periféricos.

La unión de los linfocitos con las vénulas podía bloquearse con anticuerpos que se unen con una glucoproteína específica en la superficie de los linfocitos. Esta glucoproteína linfocitaria se llamó LEU-CAM1 y, más tarde, selectina L.

Las **selectinas** forman una familia de glucoproteínas integrales de la membrana que reconocen y se unen con una disposición particular de azúcares en los oligosacáridos que sobresalen de la superficie de otras células (pág. 129). El nombre de esta clase de receptores superficiales proviene de la palabra "lectina", un término general para un compuesto que se une con grupos carbohidrato específicos. Las selectinas tienen un pequeño dominio citoplásmico, un solo dominio que cruza la membrana y un segmento extracelular grande que consiste en varios módulos separados, incluido el dominio más externo que actúa como la lectina (fig. 7-21). Existen tres selectinas conocidas: selectina E, presente en las células endoteliales, selectina P que se encuentra en las plaquetas y las células endoteliales, y selectina L, que se halla en los leucocitos (glóbulos blancos). Las tres selectinas reconocen un grupo particular de azúcares (fig. 7-21) que se encuentra en los extremos de las cadenas de carbohidratos de ciertas glucoproteínas complejas. Para que las selectinas se unan con sus carbohidratos ligando es necesaria la presencia de calcio. Como grupo, las selectinas median las interacciones transitorias entre los leucocitos circulantes y las paredes vasculares en sitios de inflamación y coagulación. No obstante, tienen otras funciones en la interacción entre las células, incluida la unión de embriones de mamífero con la pared del útero durante la implantación. El papel de las selectinas en la inflamación se describe mejor en la sección Perspectiva humana, en la página 259.

Inmunoglobulinas

El descubrimiento de la estructura de las moléculas de anticuerpo en la sangre en el decenio de 1960 fue uno de los hitos para la comprensión de la respuesta inmunitaria. Se descubrió que los anticuerpos, que son un tipo de proteína llamado inmunoglobulina (Ig), consistían en cadenas de polipéptidos compuestas de varios dominios similares. Cada uno de estos dominios Ig, como se llaman, está formado por 70 a 110 aminoácidos organizados en una estructura plegada muy ajustada, como se muestra en el recuadro de la figura 7-22. Estudios posteriores

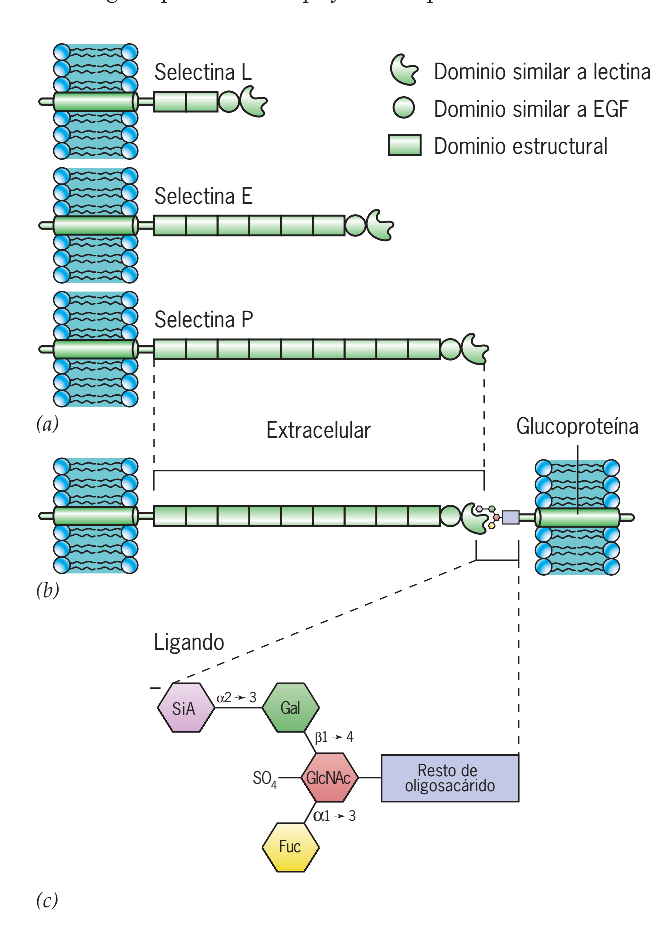


FIGURA 7-21 Selectinas. Esquema que muestra los tres tipos de selectinas conocidas (*a*) Todas ellas reconocen y se unen a un ligando carbohidrato similar en los extremos de las cadenas de oligosacáridos en las glucoproteínas, como el que se muestra en *b*). *c*) Estructura detallada del ligando carbohidrato. La fucosa terminal y la fracción de ácido siálico son muy importantes para el reconocimiento de la selectina; la fracción *N*-acetilglucosamina a menudo está unida con sulfato.

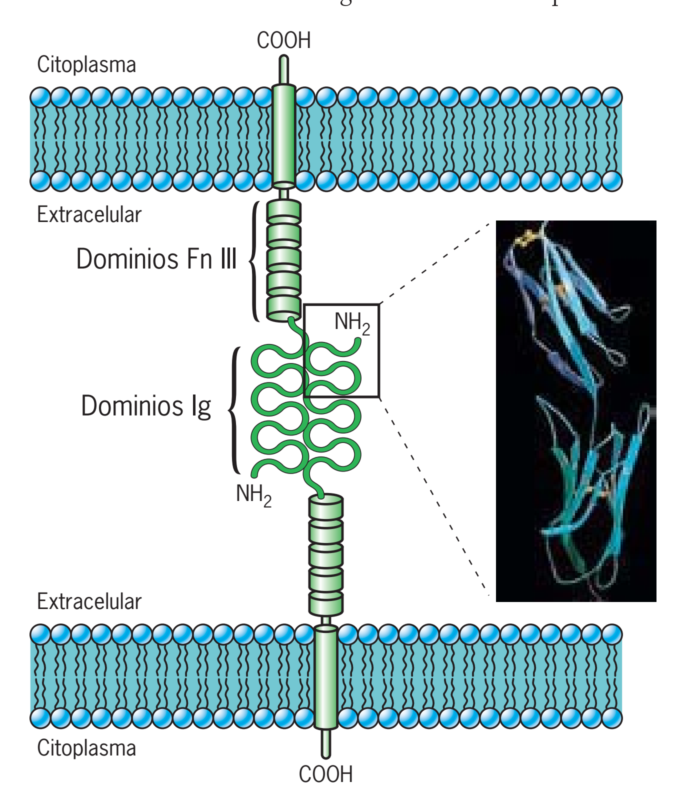


FIGURA 7-22 L1 es una molécula de adhesión celular de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig). Modelo propuesto de adhesión intercelular resultado de las interacciones específicas de los dominios de inmunoglobulina (Ig) de dos moléculas L1 que sobresalen de las superficies de células vecinas. Cada molécula L1 contiene un pequeño dominio citoplásmico, un segmento transmembranoso, varios segmentos que se parecen a un tipo de módulo encontrado en la fibronectina y seis dominios Ig situados en la porción N-terminal de la molécula. El recuadro muestra la estructura de los dos dominios Ig del extremo N de VCAM, una molécula de la IgSF en la superficie de las células endoteliales. Los dominios Ig de VCAM y L1 tienen una estructura tridimensional similar consistente en dos hojas beta unidas frente a frente. (Recuadro reimpreso con autorización de E. Yvonne Jones, et al., Nature 373:540, 1995. © 1995, Macmillan Magazines Ltd.)

tornaron aparente que los dominios de tipo Ig estaban presentes en una gran variedad de proteínas, que en conjunto constituyen la **superfamilia de inmunoglobulinas** o **IgSF**. La mayoría de los miembros de esta familia participa en varios aspectos de la función inmunitaria, pero algunos mediaban la adhesión intercelular *independiente* de calcio. De hecho, el descubrimiento de los dominios similares a Ig en los receptores de adhesión celular en los invertebrados (animales que carecen de un sistema inmunológico típico) sugiere que las proteínas similares a las inmunoglobulinas evolucionaron al principio como mediadores de adhesión celular y sólo después adquirieron sus funciones como efectores del sistema inmunológico de los vertebrados.

La mayor parte de las moléculas de adhesión celular de la IgSF media ciertas interacciones específicas de los linfocitos con las células necesarias para establecer una respuesta inmunitaria (macrófagos, otros linfocitos y células blanco). Sin embargo, algunos integrantes de esta superfamilia, como la molécula de adhesión celular vascular (VCAM), la molécula de adhesión celular neural (NCAM) y L1, median la adhesión entre células no inmunitarias. Por ejemplo, NCAM y L1 tienen funciones importantes en el crecimiento nervioso, formación de sinapsis y otros fenómenos durante el desarrollo del sistema nervioso. Al igual que la fibronectina y muchas otras proteínas participantes en la adhesión celular, las moléculas de adhesión de la IgSF tienen una construcción modular (fig. 7-22) y están formadas por dominios individuales de estructura similar a los dominios de otras proteínas.

La importancia de L1 en el desarrollo neural se reveló de varias maneras. En los seres humanos, las mutaciones en el gen L1 pueden tener consecuencias devastadoras. En los casos extremos, los niños nacen con hidrocefalia letal ("agua en el cerebro"). Los niños con mutaciones menos graves casi siempre tienen retraso mental y dificultad para controlar los movimientos de las extremidades (espasticidad). Las necropsias de pacientes que murieron a causa de la enfermedad por deficiencia de L1 revelan una situación notable: a menudo carecen de dos haces nerviosos grandes, uno que corre entre las dos mitades del cerebro y otro que va del cerebro a la médula espinal. La ausencia de estos haces nerviosos sugiere que L1 participa en el crecimiento de los axones dentro del sistema nervioso embrionario.

Varios tipos de proteínas sirven como ligandos para las moléculas de la IgSF que están en la superficie celular. Como se describió antes, la mayoría de las integrinas facilita la adhesión de las células con el sustrato, pero unas cuantas integrinas median la adhesión entre células mediante la unión con proteínas de otras células. Por ejemplo, la integrina $\alpha_4\beta_1$ en la superficie de los leucocitos se une con VCAM, una proteína de la IgSF en el recubrimiento endotelial de ciertos vasos sanguíneos.

Caderinas

Las **caderinas** son una gran familia de glucoproteínas que median la adhesión intercelular dependiente de Ca^{2+} y transmiten señales de la ECM al citoplasma. Las caderinas unen entre sí a las células de tipo similar y lo hacen sobre todo mediante la unión con la misma caderina presente en la superficie de la célula contigua. Esta propiedad de las caderinas se demostró por primera vez con la aplicación de ingeniería genética en células que en condiciones normales no se adherían para que expresaran una de varias caderinas diferentes. Luego se hicieron varias combinaciones de las células y se vigilaron sus interacciones. Se encontró que las células que expresan una especie de caderina se adhieren en forma preferencial con otras células que expresan la misma caderina.

Al igual que las selectinas y las moléculas de la IgSF, las caderinas poseen una construcción modular. Las mejor estudiadas son las caderinas E (epitelial), N (neural) y P (placentaria). Estas caderinas "típicas", como se les conoce, contienen un segmento extracelular relativamente grande consistente en cinco dominios uno tras otro de tamaño y estructura similares, un solo segmento transmembranoso y un pequeño dominio citoplásmico (fig. 7-23). El dominio citoplásmico se relaciona a menudo con miembros de la familia *catenina* de las proteínas citosólicas, las cuales tienen un doble papel: fijan las caderinas al citoesqueleto (véase fig. 7-26) y transmiten señales al citoplasma.

En la figura 7-23 se presentan algunos modelos de la adhesión de la caderina. Los estudios estructurales indican que las caderinas de la misma superficie celular se unen a otras, lado a lado para formar dímeros paralelos. Tales estudios también aclararon la función del calcio, que se conoce desde hace décadas como elemento esencial para la adhesión intercelular. Como se indica en la figura 7-23, los iones de calcio forman puentes entre dominios sucesivos de una molécula determinada, no entre moléculas de células diferentes, como se había supuesto. Estos iones de calcio mantienen la porción extracelular de cada cade-

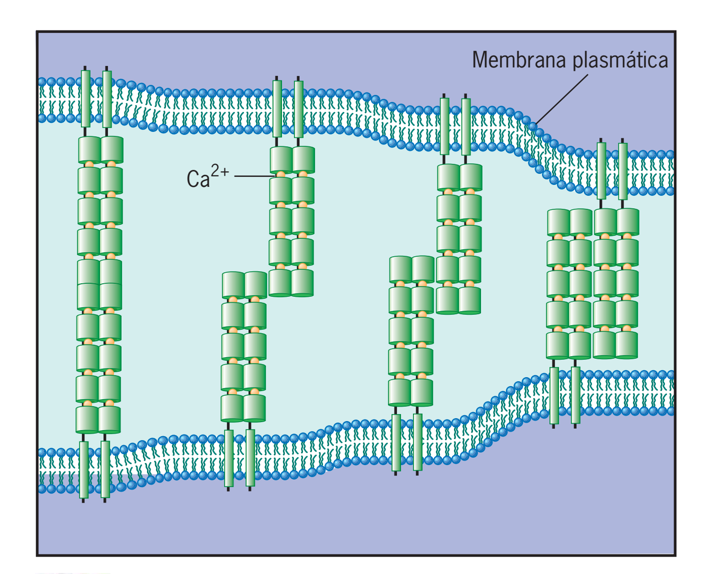


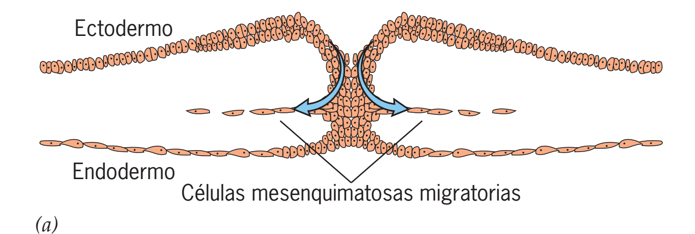
FIGURA 7-23 Caderinas y adhesión celular. Representación esquemática de dos células adheridas como resultado de las interacciones entre tipos similares de caderinas que sobresalen de la membrana plasmática de cada célula. Los iones calcio (mostrados como pequeñas esferas amarillas) se sitúan entre los dominios sucesivos de la molécula de caderina donde tienen un papel crucial en el mantenimiento de la rigidez de la porción extracelular de la proteína. Esta ilustración muestra varios modelos alternativos mediante los cuales podrían interactuar las caderinas de células adyacentes. Los diferentes estudios sugieren distintos grados de superposición (interdigitación) entre los dominios extracelulares de las moléculas de células opuestas. Estas diferencias deberían ocasionar diferencias en el espacio entre las membranas plasmáticas de células adherentes de 250 a 450 Å. Con motivos de consistencia, las figuras ulteriores muestran las caderinas con superposición de un solo dominio.

rina en la conformación rígida necesaria para la adhesión celular. La adhesión entre las células se debe a la interacción entre los dominios extracelulares de las caderinas de células adyacentes para formar una "cremallera de adhesión celular". Se suscitó una controversia considerable acerca del grado en el que las caderinas de células adyacentes se superponen una con otra, lo cual es la razón de que la figura 7-23 muestre varias configuraciones alternativas. Es posible que los distintos tipos de células participen en diferentes tipos de interacciones, de manera que varias (o todas) las configuraciones mostradas en la figura 7-23 pueden ocurrir en un organismo. Tal y como las interdigitaciones de la caderina pueden compararse con una cremallera, los cúmulos de caderina pueden hacerlo con el cierre de contacto (velcro); mientras mayor sea el número de caderinas en un cúmulo, mayor es la fuerza de adhesión entre las células adyacentes.

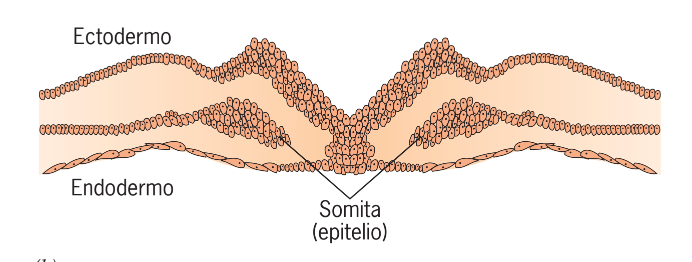
Se piensa que la adhesión mediada por caderinas es la razón de la capacidad de las células similares para "elegirse" en agregados mixtos, como se ilustra en la figura 7-20. De hecho, las caderinas pueden ser el factor individual más importante en el moldeado de las células para formar tejidos cohesivos en el embrión y para mantenerlos unidos en el adulto. Como se describe en la sección Perspectiva humana, es probable que la pérdida de la función de las caderinas tenga un papel clave en la diseminación de los tumores malignos.

El desarrollo embrionario se caracteriza por el cambio: cambio de la expresión génica, cambio de la forma celular, cambio de la motilidad celular, cambio de la adhesión celular, etc. Se piensa que las caderinas median muchos de los cambios dinámicos en los contactos adhesivos necesarios para construir los tejidos y órganos de un embrión, lo que se conoce como *morfogénesis*. Por ejemplo, en varios procesos morfogenéticos que ocurren durante el desarrollo embrionario participa un grupo de células que cambian de un epitelio (capa de células organizadas estrechamente adheridas) a un mesénquima (células básicamente no adhesivas en unión laxa), o viceversa. La transición mesénquima-epitelio la ilustra el movimiento de las células mesodérmicas durante la gastrulación. Típicamente, estas células se separan de una capa cohesiva en la superficie de la gástrula temprana y se mueven hacia las regiones interiores como células mesenquimatosas (fig. 7-24*a*). Después de cierto periodo, muchas de estas mismas células recuperan sus propiedades adhesivas y forman de nueva cuenta un epitelio, como los somitas que se forman a lo largo de la línea media dorsal del embrión (fig. 7-24*b*). En una etapa más avanzada, las células de ciertas partes de los somitas pierden su adhesividad y comienzan a desplazarse de nuevo como mesénquima (fig. 7-24*c*) hasta la extremidad en desarrollo para convertirse en músculo o cartílago, o debajo de la epidermis en desarrollo para convertirse en los tejidos dérmicos. Las caderinas (y otras moléculas de adhesión celular) tienen un papel clave en estos fenómenos porque cambian las propiedades adhesivas de las células. La agregación de las células en un epitelio, como los somitas, se acompaña de la aparición de caderina N en las superficies de las células (fig. 7-24*d*), un fenómeno que era de esperarse para promover la adhesión entre las células. Por otro lado, la dispersión de las células a partir de un epitelio se relaciona con la desaparición de la caderina N.

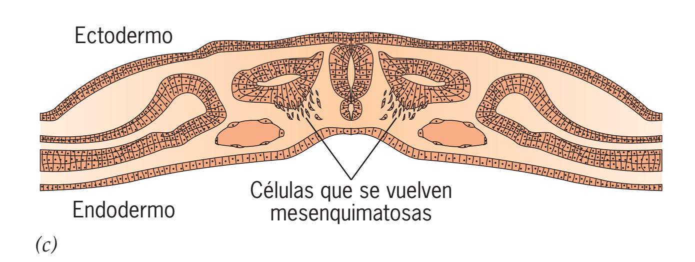
En tanto las caderinas tienen una distribución típica difusa en todas las superficies de dos células adherentes, también participan en la formación de uniones intercelulares especializadas, que son el tema de la sección siguiente.



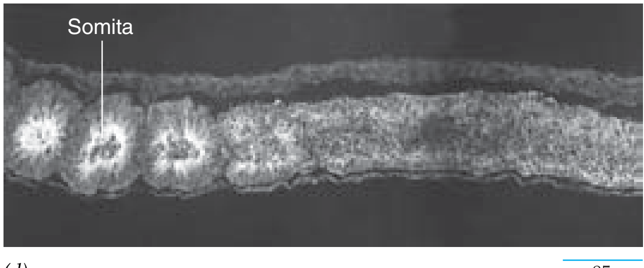
(*a*)



(*b*)



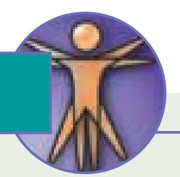
(*c*)



(*d*) 85 μm

FIGURA 7-24 Las caderinas y la transformación epitelial mesenquimatosa. *a–c*) Etapas del desarrollo temprano de un embrión de pollo. *a*) Durante la gastrulación, las células de la capa superior del embrión (el epiblasto) migran hacia una hendidura en el centro del embrión, se insertan en dicha hendidura y luego migran hacia los lados como células mesenquimatosas en el espacio que hay por debajo del epiblasto. *b*) Algunas de esas células mesenquimatosas se reúnen en bloques de células epiteliales y forman los somitas. *c*) En una etapa posterior del desarrollo, una parte de la pared de cada somita se transforma en células mesenquimatosas que migran a varios tejidos periféricos. *d*) Corte sagital a través del embrión de pollo al nivel de los somitas. La parte anterior del embrión se muestra a la izquierda y la posterior a la derecha. El eje anteroposterior del embrión de pollo es una especie de línea del tiempo en el desarrollo; ciertos fenómenos ocurren primero en la parte anterior, como la formación de los distintos somitas, y después se producen en las regiones posteriores. En esta fotografía se advierte la localización de la caderina N con inmunofluorescencia en el epitelio del somita. La formación de somitas, que se observa de manera progresiva de las porciones anteriores a las posteriores del embrión, está relacionada con la síntesis de caderina N. (*D*, TOMADA DE KOHEI HATTA, SHIN TAGAKI, HAJIME FUJISAWA Y MASATOSHI TAKEICHI, DEV BIOL 120:218, 1987.)

PERSPECTIVA HUMANA



El papel de la adhesión celular en la inflamación y la metástasis

La inflamación es una de las reacciones primarias a la infección. Si una parte del cuerpo se contamina con bacterias, como podría ocurrir después de una herida punzante en la piel, el sitio de la lesión se convierte en un magneto para diversos leucocitos. Se estimula a estos últimos (glóbulos blancos), que en condiciones normales permanecen en la sangre, para que crucen la capa endotelial que recubre las venas más pequeñas (vénulas) en la región y entren al tejido. Una vez en el tejido, los leucocitos se mueven hacia los microorganismos invasores como respuesta a las señales químicas e ingieren a los microbios.[a] Aunque la inflamación es una reacción protectora, también tiene efectos colaterales adversos, como la fiebre, aumento de volumen local por la acumulación de líquido, enrojecimiento y dolor.

También es posible que la inflamación se active en forma inadecuada. Por ejemplo, puede haber daño en los tejidos del corazón o el cerebro cuando el flujo sanguíneo a estos órganos se bloquea durante un infarto del miocardio o un episodio vascular cerebral. Cuando se restaura el flujo sanguíneo al órgano, los leucocitos circulantes pueden atacar el tejido dañado, lo que produce un trastorno conocido como *daño por reperfusión.* Una reacción inflamatoria exagerada también puede ocasionar asma, síndrome de choque tóxico y síndrome de insuficiencia respiratoria. Se realiza una investigación intensa sobre preguntas relacionadas con estos trastornos: ¿cómo confluyen los leucocitos en los sitios de inflamación?, ¿por qué son capaces de detener su flujo en la corriente sanguínea y adherirse a las paredes vasculares?, ¿cómo penetran las paredes de los vasos?, ¿cómo pueden bloquearse algunos efectos colaterales negativos de la inflamación sin interferir con los aspectos benéficos de la reacción? Las respuestas a las preguntas sobre la inflamación se enfocaron en tres tipos de moléculas para adhesión celular: selectinas, integrinas y proteínas de la superfamilia de inmunoglobulinas.

La figura 1 muestra una propuesta de la cadena de fenómenos que ocurre durante la inflamación. El primer paso comienza cuando las paredes de las vénulas se activan como respuesta a "señales" químicas del tejido dañado cercano. Las células endoteliales que recubren estas vénulas se vuelven más adhesivas para los neutrófilos circulantes, un tipo de leucocito fagocítico que lleva a cabo un ataque rápido e inespecífico a los patógenos invasores. Este cambio en la adhesión lo media una presentación transitoria de selectinas P y E en las superficies de las células endoteliales activadas en el área dañada (paso 2, fig. 1). Cuando los neutrófilos encuentran las selectinas, forman adhesiones transitorias que reducen de manera drástica su movimiento por el vaso. En esta etapa puede verse que los neutrófilos "ruedan" con lentitud sobre la pared vascular. Varias compañías biotecnológicas intentan desarrollar fármacos antiinflamatorios que interfieran con la unión de los ligandos con las selectinas E y P. Los anticuerpos contra selectina bloquean el rodamiento de los neutrófilos sobre las superficies cubiertas con selectinas in vitro y suprimen la inflamación y el daño por reperfusión en animales. Se obtuvo un efecto bloqueador similar con carbohidratos sintéticos (p. ej., efomicinas) que se unen con las selectinas E y P, con lo que compiten con los carbohidratos ligandos en las superficies de los neutrófilos.

Cuando los neutrófilos interactúan con el endotelio inflamado de la vénula, un proceso de activación (desencadenado por varios agentes, incluido el *factor activador plaquetario* liberado por el endotelio) produce un aumento de la actividad de unión de ciertas integrinas (p. ej., $\alpha_L\beta_2$ y $\alpha_M\beta_2$) que ya están situadas en la superficie de los neutrófilos (fig. 1, paso 3). Después, las integrinas activadas se unen con gran afinidad con las moléculas de la IgSF (p. ej., ICAM) en la superficie de las células endoteliales, lo que hace que los neutrófilos detengan su rodamiento y se adhieran con firmeza a la pared vascular (paso 4). Los neutrófilos unidos cambian de forma y se exprimen entre las células endoteliales adyacentes para entrar al tejido dañado (paso 5). Los neutrófilos invasores parecen capaces de separar las uniones adherentes (pág. 260) que constituyen la principal barrera entre las células de la pared vascular. Esta cascada de fenómenos, que incluye varios tipos diferentes de moléculas de adhesión celular, asegura que la unión de las células sanguíneas a las paredes de los vasos sanguíneos y la penetración posterior ocurra sólo en sitios en los que se necesita la invasión leucocitaria.

La importancia de las integrinas en la reacción inflamatoria se demuestra en una rara enfermedad llamada *deficiencia de adhesión leucocitaria* (*DAL*). Las personas con este padecimiento son incapaces de producir las subunidades β_2 como parte de varias integrinas leucoci-

[a] Se pueden encontrar imágenes de un leucocito "persiguiendo" a una bacteria en Internet si se buscan las palabras clave "arrastre leucocitario".

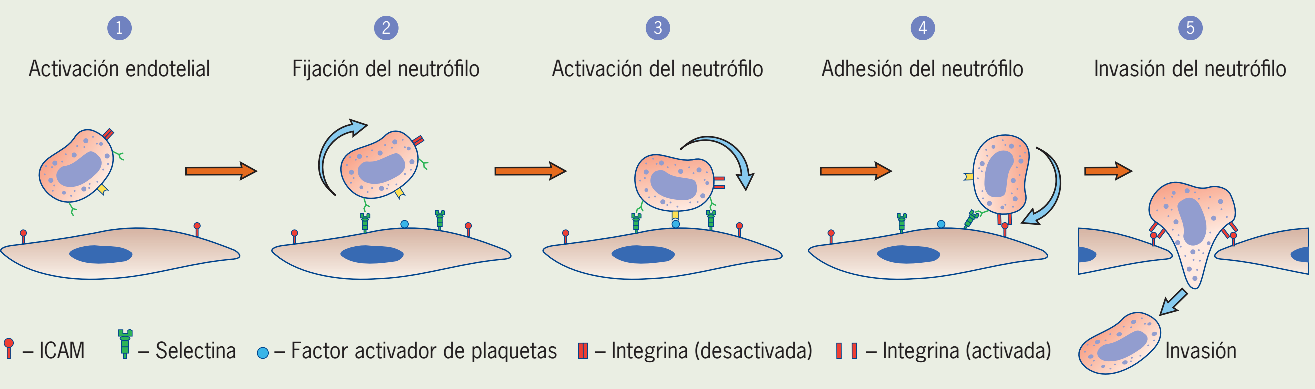


FIGURA 1 Pasos del movimiento de neutrófilos durante la inflamación a partir de la corriente sanguínea. Los pasos se describen en el texto.

tarias. Como resultado, los leucocitos de estas personas carecen de la capacidad para adherirse a la capa endotelial de las vénulas, un paso necesario para su salida de la corriente sanguínea. Estos individuos sufren infecciones bacterianas repetidas que ponen en riesgo su vida. La mejor forma de tratar esta anormalidad es el trasplante de médula ósea, el cual suministra al paciente las células primordiales capaces de formar leucocitos normales. La administración de anticuerpos contra la subunidad β_2 puede simular los efectos de la DAL y bloquea el movimiento de neutrófilos y otros leucocitos fuera de los vasos sanguíneos. Estos anticuerpos podrían ser útiles para prevenir las reacciones inflamatorias relacionadas con afecciones, como el asma y la artritis reumatoide, o la reperfusión.

El cáncer es una enfermedad en la que las células escapan de los mecanismos normales de control del crecimiento del cuerpo y proliferan sin regulación. Si las células malignas permanecieran en una sola masa, como ocurre a menudo en algunos tipos de cáncer cutáneo o cáncer tiroideo, casi todos los tumores malignos serían fáciles de curar mediante la extirpación quirúrgica del tejido enfermo. Sin embargo, la mayor parte de las tumoraciones malignas generan células capaces de salir del tumor primario y entrar a la corriente sanguínea o conductos linfáticos, lo que inicia el crecimiento de tumores secundarios en otras partes del cuerpo. La diseminación de un tumor dentro del cuerpo se conoce como **metástasis** y es la razón por la que el cáncer es una anomalía devastadora. Se cree que las células metastásicas (células cancerosas que pueden iniciar el desarrollo de tumores secundarios) tienen propiedades especiales en la superficie celular que no comparten la mayoría de las otras células del tumor. Por ejemplo, pueden mencionarse las siguientes:

1. Las células metastásicas deben ser menos adhesivas que las demás para liberarse de la masa tumoral.
2. Deben ser capaces de penetrar muchas barreras, como las matrices extracelulares del tejido conjuntivo circundante y las membranas basales que recubren los vasos sanguíneos que las trasladan a sitios distantes.
3. Deben ser capaces de invadir tejidos normales para formar colonias secundarias.

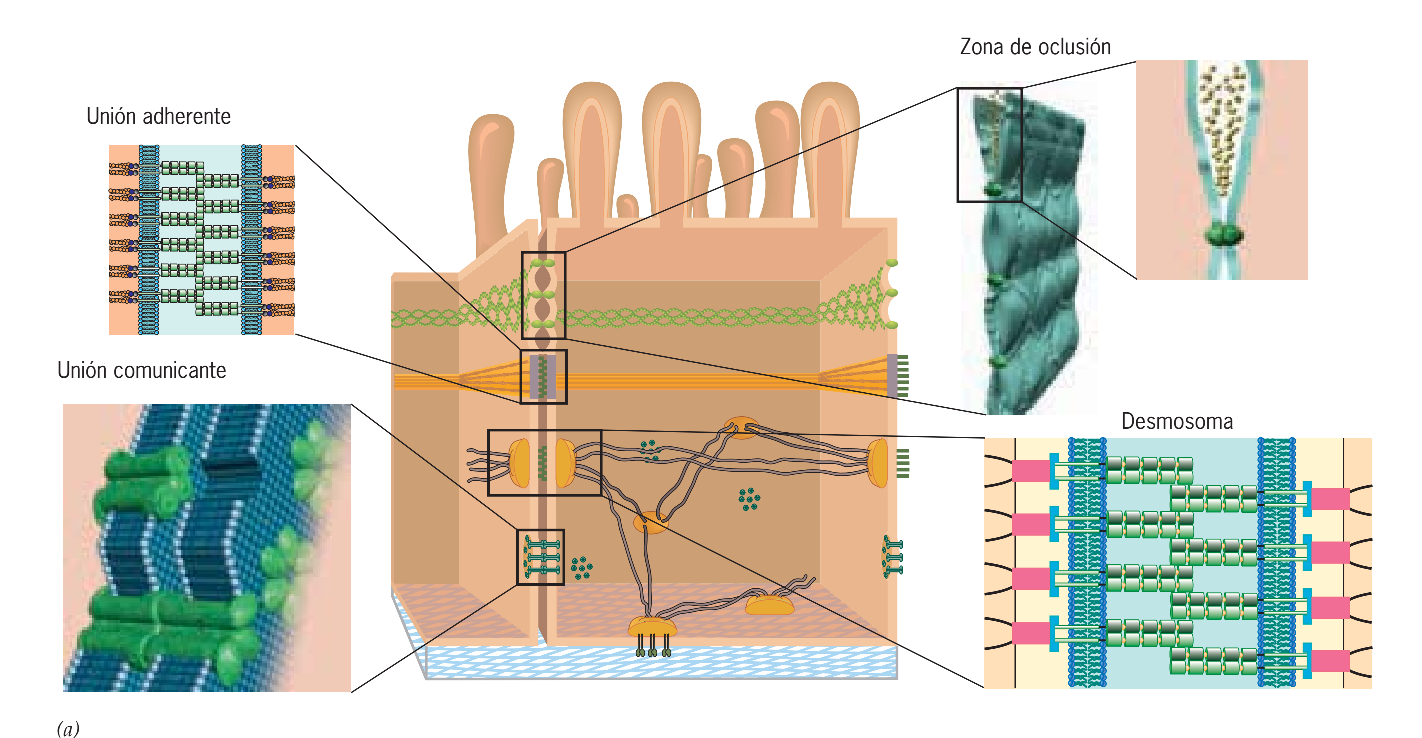
La penetración de las matrices extracelulares se logra sobre todo mediante enzimas que digieren la ECM, en particular las metaloproteinasas de la matriz descritas en la página 248. En algunos tipos de cáncer, las células secretan sus propias MMP, pero en la mayoría de los tumores en crecimiento inducen la síntesis y secreción de estas enzimas en las células "hospedadoras" próximas. De cualquier forma, estas enzimas degradan las proteínas y proteoglucanos que obstaculizan la migración de las células cancerosas. Además, la escisión de determinadas proteínas de la ECM por las MMP produce fragmentos proteínicos activos que actúan otra vez de regreso en las células cancerosas estimulando su proliferación y carácter invasor. A causa de esta participación aparente en el desarrollo de los tumores malignos, las MMP se convirtieron en un blanco prominente de la industria farmacéutica. Una vez que se demostró que los inhibidores sintéticos de las MMP pueden reducir las metástasis en ratones, se realizaron varias pruebas clínicas con estos fármacos en pacientes con diversos cánceres avanzados e inoperables. Hasta ahora, estos inhibidores parecen poco prometedores para detener la progresión avanzada de los tumores y, en algunos casos, ocasionaron daño articular. Hasta el momento, el único inhibidor de MMP aprobado por la FDA (Periostat) se emplea en el tratamiento de la enfermedad periodontal.

Los cambios de las cifras y tipos de varias moléculas de adhesión celular, y por tanto de la capacidad de las células para adherirse a otras células o a las matrices extracelulares, también se refirieron en la promoción de las metástasis. Los principales estudios en esta área se han concentrado en la caderina E, que es la molécula de adhesión celular predominante de las uniones adherentes que mantienen las células epiteliales en una lámina cohesiva. La pérdida de la caderina E de las células epiteliales normales, como ocurre durante el desarrollo embrionario, se vincula con la conversión de las células en un fenotipo mesenquimatoso, más móvil (pág. 258), muy similar al de la mayor parte de las células cancerosas. Las investigaciones con diversos tumores de células epiteliales (p. ej., de mama, próstata y colon) confirman que estas células malignas tienen concentraciones muy reducidas de caderina E; a menor nivel de expresión de caderina E, mayor potencial metastásico de la célula. A la inversa, cuando se obliga a las células malignas a expresar copias adicionales del gen para caderina E, las células pierden capacidad para producir tumores cuando se les inyecta en animales. Se cree que la presencia de caderina E favorece la adhesión de las células entre sí y suprime la dispersión de células neoplásicas a sitios distantes. También es posible que la caderina E inhiba las vías de señalización celular que conducen a la invasión hística y metástasis. La relevancia de la caderina E resulta evidente a partir de un estudio de una familia de nativos de Nueva Zelanda en la que 25 de sus miembros tuvo cáncer gástrico en un periodo de 30 años. El análisis del DNA de los integrantes de la familia reveló que las personas susceptibles tenían mutaciones en el gen que codifica la caderina E.

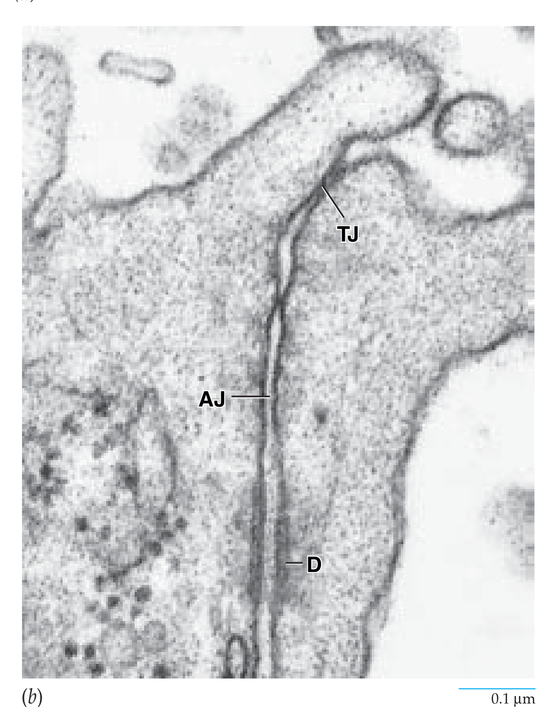
Uniones adherentes y desmosomas: fijación de unas células con otras

Las células de ciertos tejidos, en especial epitelios y músculo cardiaco, son muy difíciles de separar entre sí porque se mantienen juntas mediante uniones adhesivas especializadas dependientes de calcio. Existen dos tipos principales de uniones adhesivas: las uniones adherentes y los desmosomas. Además de las uniones adherentes, las células epiteliales contienen con frecuencia otros tipos de uniones celulares que también se localizan sobre sus superficies laterales, cerca de la luz apical (fig. 7-25). Cuando estas uniones se ordenan de cierta manera, este tipo de especialización superficial se denomina *complejo de unión.* Las estructuras y funciones de las dos uniones adhesivas del complejo se describen en los párrafos siguientes, mientras que la discusión de los otros tipos de uniones epiteliales (zonas de oclusión y uniones comunicantes) se presenta más adelante en este capítulo.

Las **uniones adherentes** se hallan en varios sitios del cuerpo. Son muy frecuentes en los epitelios, como el recubrimiento intestinal, donde se encuentran como un "cinturón" (o *zónula adherente*) que rodea a cada una de las células cerca de su superficie apical y unen a la célula con sus vecinas (fig. 7-25*a*). Las células de una unión adherente se mantienen unidas por enlaces dependientes de calcio que se forman entre los dominios extracelulares de las moléculas de caderina que salvan las brechas de 30 nm que hay entre las células vecinas (fig. 7-26). Como lo ilustra la figura 7-26, el dominio citoplásmico de estas caderinas se une mediante cateninas alfa y beta con diversas proteínas citoplásmicas, incluidos los filamentos de actina del citoesqueleto. Por lo tanto, al igual que las integrinas de una adhesión focal, los cúmulos de caderina de una unión adherente conectan el



(*a*)



(*b*)

FIGURA 7-25 Complejo de unión intercelular. *a*) Esquema que muestra un complejo de unión en las superficies laterales de una célula epitelial cilíndrica simple. El complejo consiste en una zona de oclusión, una unión adherente y un desmosoma (mácula adherente). Otros desmosomas y uniones comunicantes se localizan en un plano más profundo sobre las superficies laterales de las células. Las uniones adherentes y las zonas de oclusión rodean la célula, mientras que los desmosomas y las uniones comunicantes se limitan a un sitio particular entre las células adyacentes. Los hemidesmosomas se muestran en la superficie celular basal. *b*) Micrografía electrónica de un complejo de unión entre dos células epiteliales de la vía respiratoria de una rata (TJ, zona de oclusión; AJ, unión adherente; D, desmosoma). (*B*, TOMADA DE EVELINE E. SCHNEEBERGER Y ROBERT D. LYNCH. AM J PHYSIOL 262:L648, 1992.)

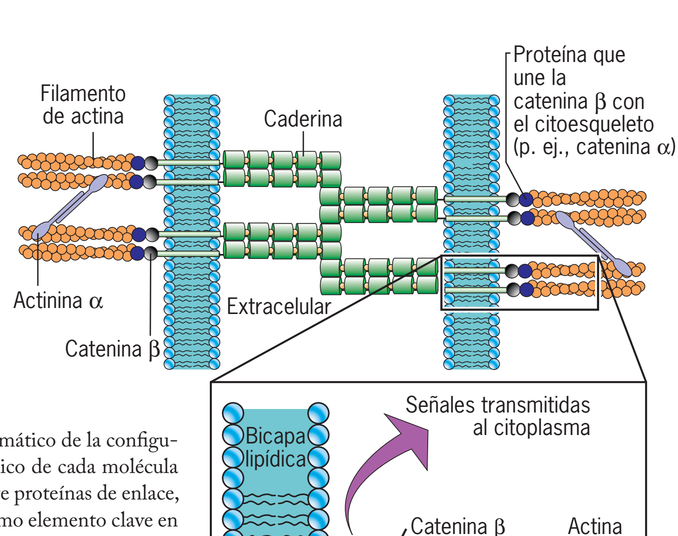


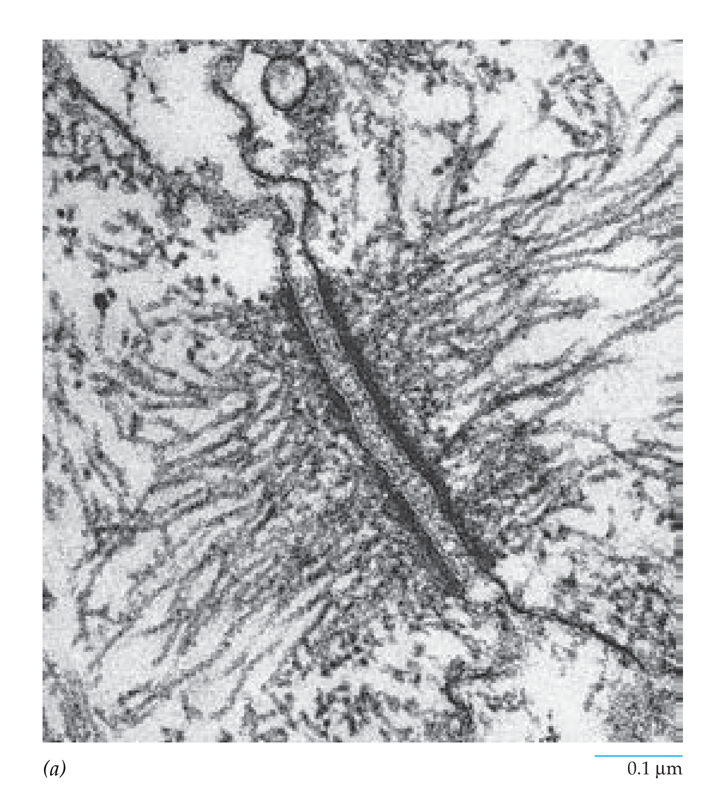
FIGURA 7-26 La estructura de la unión adherente. Modelo esquemático de la configuración molecular de una zónula adherente. El dominio citoplásmico de cada molécula de caderina se conecta con los filamentos de actina del citoesqueleto mediante proteínas de enlace, incluidas las cateninas beta y alfa. La catenina beta también se ha referido como elemento clave en una vía de señalización que va de la superficie celular al núcleo, pero que tal vez no esté vinculada con su presencia en las uniones adherentes. Otro miembro de la familia de la catenina, la catenina p120, se une con un sitio del dominio citoplásmico de la caderina. La catenina p120 puede regular la fuerza adhesiva de la unión y servir como componente de la vía de señalización. No se indican muchas otras proteínas que se encuentran en estas uniones.

ambiente exterior con el citoesqueleto de actina y proporcionan una vía potencial para que se transmitan las señales del exterior celular al citoplasma. Como ejemplo, las uniones adherentes situadas entre células endoteliales que recubren las paredes de los vasos sanguíneos transmiten señales que aseguran la supervivencia de las células. Los ratones que carecen de una caderina de las células endoteliales son incapaces de transmitir estas señales de supervivencia y estos animales fallecen durante la etapa embrionaria como consecuencia de la muerte de las células que recubren los vasos sanguíneos.

Los **desmosomas** (o *máculas adherentes*) son uniones adhesivas con forma de disco de 1 μm de diámetro (fig. 7-27*a*) que se encuentran en diversos tejidos. Los desmosomas son muy abundantes en los tejidos sometidos a tensión mecánica, como el músculo cardiaco y las capas epiteliales de la piel y el cuello uterino. Al igual que las uniones adherentes, los desmosomas contienen caderinas que unen dos células a través de una brecha intercelular estrecha (30 nm). Las caderinas de los desmosomas poseen una estructura de dominios diferente respecto de las caderinas comunes que se encuentran en las uniones adherentes y se conocen como *desmogleínas* y *desmocolinas* (fig. 7-27*b*). Las placas citoplásmicas densas de la superficie interna de las membranas plasmáticas sirven como sitios de fijación para los filamentos intermediarios curvos similares a los de los hemidesmosomas (fig. 7-19). La red tridimensional de filamentos intermediarios similares a cuerdas suministran continuidad estructural y fuerza tensional a toda la hoja de células. Los filamentos intermediarios se unen con los dominios citoplásmicos de las caderinas del desmosoma mediante proteínas adicionales, como se muestra en la figura 7-27*b*. La importancia de las caderinas para el mantenimiento de la integridad estructural de un epitelio se ilustra en una enfermedad autoinmunitaria (*pénfigo vulgar*) en la que se producen anticuerpos contra una de las desmogleínas. La enfermedad se caracteriza por la pérdida de adhesión entre las células de la epidermis con formación de vesículas graves en la piel.

El papel de los receptores de adhesión celular en la señalización transmembranosa

La figura 7-28 presenta un resumen de algunos de los puntos que se han explicado en este capítulo. La representación muestra cada uno de los cuatro tipos de moléculas de adhesión descritas y sus interacciones con los materiales extracelulares y citoplásmicos. Una de las funciones de las proteínas integrales de la membrana es transferir información a través de la membrana plasmática, un proceso que se conoce como **señalización transmembranosa**. Aunque este tema se analiza con detalle en el capítulo 15, puede señalarse que los cuatro tipos de moléculas de adhesión celular ilustrados en la figura 7-28 tienen la capacidad de realizar esta función. Por ejemplo, las integrinas y las caderinas pueden transmitir señales del ambiente extracelular al citoplasma mediante los enlaces con el citoesqueleto y las moléculas reguladoras del citosol, como las cinasas de proteína y proteínas G. Las cinasas de proteína activan (o inhiben) sus proteínas blanco mediante fosforilación, mientras que las proteínas G activan (o inhiben) sus proteínas blanco mediante interacción física (véase fig. 15-19*b*). La unión de una integrina con su ligando puede inducir diversas reacciones dentro de una célula, incluidos los cambios en el pH citoplásmico o la concentración de Ca^{2+}, fosforilación de proteínas y expresión de genes. A su vez, estos cambios pueden alterar el potencial celular de crecimiento, la actividad migratoria, el estado de diferenciación o la supervivencia. Este tipo de fenómeno se ilustra con las células de glándula mamaria que se presentan en la figura 7-29. Cuando estas células se retiran de una glándula mamaria y crecen en una caja de cultivo



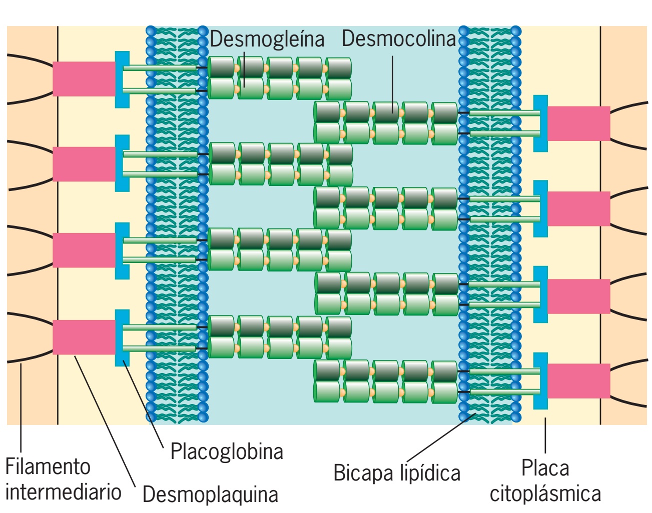


FIGURA 7-27 La estructura del desmosoma. *a*) Micrografía electrónica de un desmosoma de epidermis de tritón. *b*) Modelo esquemático de la configuración molecular de un desmosoma. (*A*, TOMADA DE DOUGLAS E. KELLY, J CELL BIOL 28:51, 1966. CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

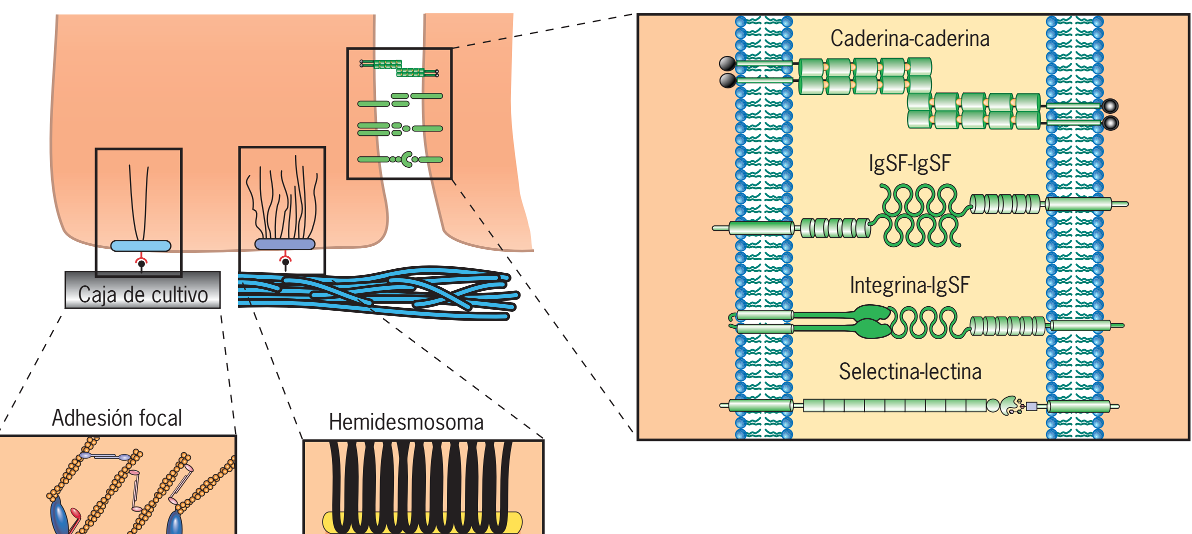


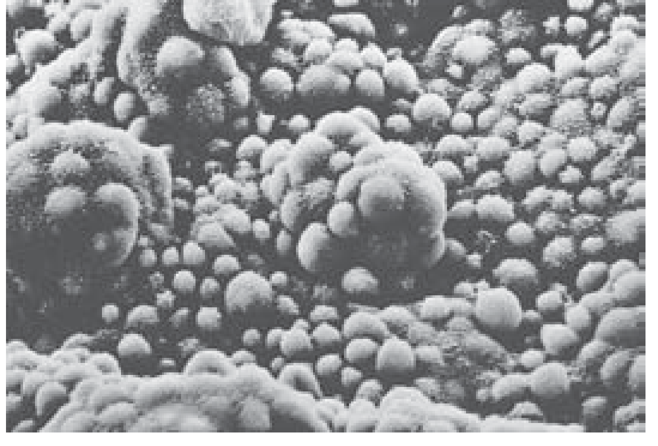
FIGURA 7-28 Revisión de los tipos de interacciones que suceden en la superficie celular. Se muestran cuatro tipos de interacciones adhesivas entre células, así como dos tipos de interacciones entre las células y el sustrato extracelular. Hay que tener presente que las diversas interacciones mostradas aquí no ocurren en un solo tipo celular, sino que se muestran de esta manera con fines ilustrativos. Por ejemplo, las interacciones entre las selectinas y las lectinas tienen lugar sobre todo entre los leucocitos circulantes y las paredes de los vasos sanguíneos.

desnudo, pierden su capacidad para sintetizar las proteínas de la leche y se ven como células aplanadas e indiferenciadas (fig. 7-29*a*). Cuando estas mismas células indiferenciadas se cultivan en presencia de ciertas moléculas extracelulares (p. ej., laminina), recuperan su apariencia diferenciada y se organizan en estructuras glandulares productoras de leche (fig. 7-29*b*). Se cree que la laminina estimula las células mamarias mediante la unión con integrinas de la superficie celular y la activación de las cinasas en la superficie interna de la membrana (como en la figura 7-17*c*).

REVISIÓN ?

1. Distinga entre un hemidesmosoma y un desmosoma, y entre un desmosoma y una unión adherente.
2. ¿Qué tipos de uniones celulares poseen filamentos de actina?, ¿cuáles contienen filamentos intermediarios?, ¿cuáles tienen integrinas y cuáles caderinas?
3. ¿En qué difieren las caderinas, los miembros de la IgSF y las selectinas a nivel molecular respecto de la forma en que median la adhesión celular?

(*a*)



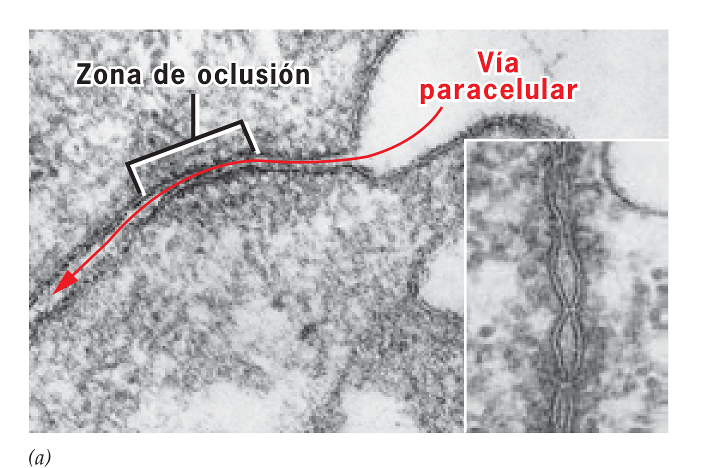
(*b*)

FIGURA 7-29 La función de las proteínas extracelulares en el mantenimiento del estado diferenciado de las células. *a*) Estas células epiteliales de la glándula mamaria de ratón se cultivaron en ausencia de una matriz extracelular. A diferencia de las células mamarias diferenciadas normales, estas células están aplanadas y no sintetizan proteínas de leche. *b*) Cuando se agregaron moléculas de matriz extracelular de nueva cuenta al cultivo, las células recuperaron su apariencia diferenciada y sintetizaron proteínas de la leche. (CORTESÍA DE JOANNE EMERMAN.)

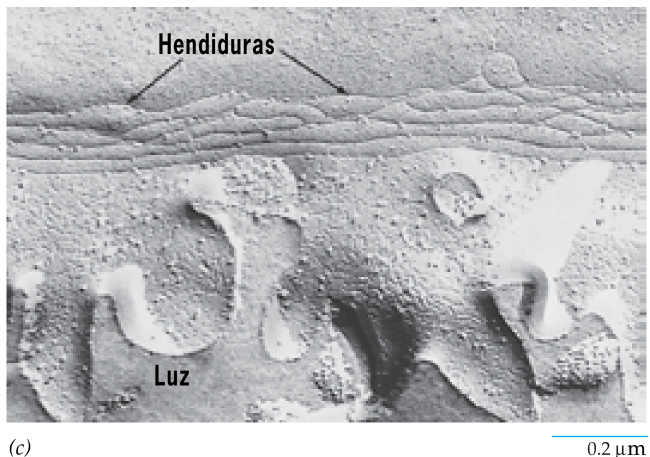
7.4 ZONAS DE OCLUSIÓN: SELLADO DEL ESPACIO EXTRACELULAR

Un epitelio simple, como el recubrimiento intestinal o pulmonar, está formado por una capa de células que se adhieren con firmeza entre sí para formar una hoja celular delgada. Desde hace varios años, los biólogos saben que cuando ciertos tipos de epitelio, como la piel de rana o la pared de la vejiga urinaria, se montan entre dos compartimientos que contienen diferentes concentraciones de solutos se observa muy poca difusión de iones o solutos a través de la pared del epitelio de un compartimiento al otro. Dada la impermeabilidad de las membranas plasmáticas, no es sorprendente que los solutos no puedan difundirse con libertad a través de las células de una capa epitelial. Empero, ¿por qué no son capaces de pasar entre las células mediante la *vía paracelular* (como en la figura 7-30*a*)? La razón se tornó aparente en el decenio de 1960 con el descubrimiento de contactos especializados llamados **zonas de oclusión** entre las células epiteliales contiguas.

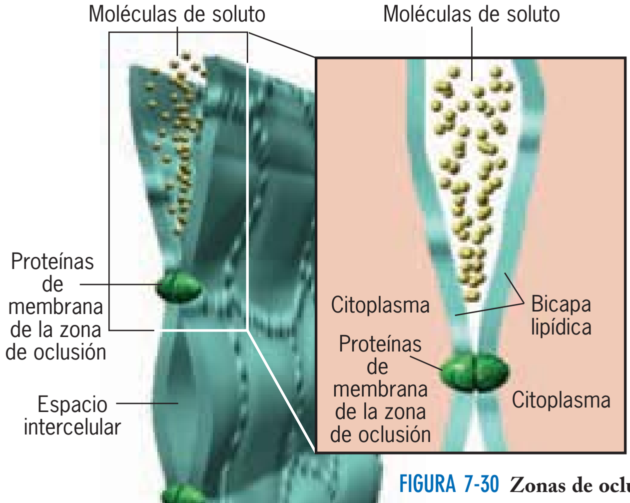
Las zonas de oclusión se localizan en el extremo apical del complejo de unión entre las células epiteliales adyacentes (véase fig. 7-25). En la figura 7-30*a* se muestra una micrografía electrónica de un corte a través de la zona de oclusión que se cortó para incluir las membranas plasmáticas de las células adyacentes. En el recuadro de la figura 7-30*a* se observa una amplificación



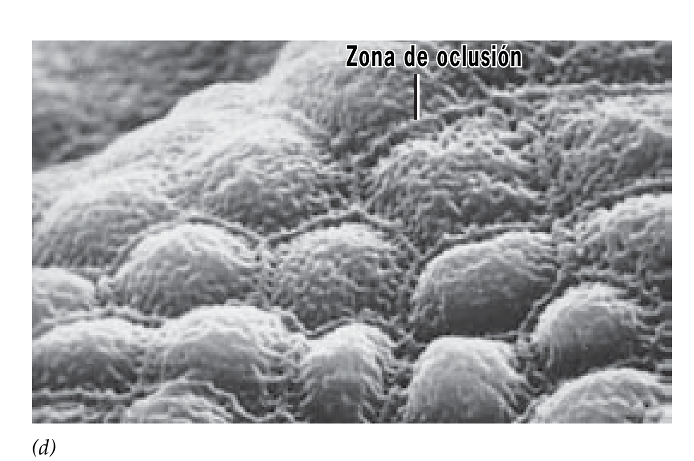
(a)



(c)



(b)



(d)

FIGURA 7-30 Zonas de oclusión. *a*) Micrografía electrónica de un corte a través de la región apical de dos células epiteliales adyacentes que muestra el sitio en el que las membranas plasmáticas de las dos células se unen en puntos intermitentes dentro de la zona de oclusión. El recuadro muestra la estructura de la zona de oclusión a mayor aumento. Las zonas de oclusión bloquean la difusión de solutos por la vía paracelular entre las células. *b*) Modelo de una zona de oclusión que muestra los puntos intermitentes de contacto entre las proteínas integrales de las dos membranas que se unen. Cada uno de estos sitios de contacto se extiende como un par de hileras de proteínas dentro de las membranas y forma una barrera que bloquea el paso de solutos por el espacio entre las células. *c*) Réplica con técnica de congelamiento y fractura que muestra la cara E de la membrana plasmática de una de las células en una región de una zona de oclusión. Las hendiduras en la cara E permanecen después de traccionar las proteínas integrales de membrana de esta mitad de la membrana. *d*) Micrografía electrónica de barrido de la superficie apical de un epitelio que revela la naturaleza circular de las zonas de oclusión. (*A*, CORTESÍA DE DANIEL S. FRIEND; RECUADRO CORTESÍA DE HIROYUKI SASAKI Y SHOICHIRO TSUKITA; *C*, TOMADA DE PHILIPPA CLAUDE Y DANIEL A. GOODENOUGH, J CELL BIOL 58:390, 1973. CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DE ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS; *D*, CORTESÍA DE D. TARIN.)

con mayor detalle que muestra la interacción entre las membranas de una TJ. Es claro que las membranas adyacentes hacen contacto en puntos intermitentes, en lugar de estar fusionadas en una superficie amplia. Como se indica en la figura 7-30*b*, los puntos de contacto entre las células son sitios en los que las proteínas integrales de dos membranas adyacentes se hallan en el espacio extracelular.

La técnica de congelamiento y fractura, que permite la observación de las caras internas de una membrana (fig. 4-13), muestra que las membranas plasmáticas de una zona de oclusión contienen hebras interconectadas (fig. 7-30*c*) que discurren paralelas entre sí y con la superficie apical del epitelio. Las fibras (o hendiduras en la cara opuesta de una membrana fracturada) corresponden a pares de hileras de proteínas integrales de membrana alineadas que se ilustran en el recuadro de la figura 7-30*b*. Las proteínas integrales de las zonas de oclusión forman fibrillas continuas que rodean por completo a la célula, como una junta, y establecen contacto con las células próximas por todos lados (fig. 7-30*d*). Como resultado, las zonas de oclusión sirven como barrera a la difusión libre de agua y solutos del compartimiento extracelular por un lado de una hoja epitelial hacia el otro lado. Las zonas de oclusión también sirven como "vallas" que ayudan a mantener el carácter polarizado de las células epiteliales (véase fig. 4-29). Esta función la realizan mediante el bloqueo de la difusión de proteínas integrales entre el dominio apical de la membrana plasmática y sus dominios lateral y basal. Como otros sitios de adhesión celular, las zonas de oclusión también participan en vías de señalización que regulan numerosos procesos celulares.

No todas las zonas de oclusión poseen las mismas propiedades de permeabilidad. Parte de la explicación puede verse al microscopio electrónico: zonas de oclusión con varias hebras paralelas (como la de la figura 7-30*c*) tienden a formar mejores sellos que las uniones con sólo una o dos hebras. No obstante, el asunto implica más que el número de hebras. Algunas zonas de oclusión son permeables a iones o solutos específicos a los que otras zonas de oclusión son impermeables. Estudios recientes brindan información considerable sobre la base molecular de la permeabilidad de las zonas de oclusión.

Hasta 1998 se pensó que las hebras de las zonas de oclusión se componían de una sola proteína, la *ocludina*. Después se encontró que las células cultivadas que carecían del gen para la ocludina, y que por tanto no producían esta proteína, aún podían formar hebras de la zona de oclusión con estructura y función normales. Estudios posteriores realizados por Shoichiro Tsukita y colaboradores en la *Universidad de Kyoto* condujeron al descubrimiento de una familia de proteínas llamadas *claudinas* que son el componente principal de las hebras en las zonas de oclusión. La micrografía electrónica de la figura 7-31 muestra que la ocludina y la claudina están juntas dentro de las fibrillas lineales de una zona de oclusión. Se han identificado por lo menos 24 claudinas diferentes y las diferencias en la distribución de estas proteínas podrían explicar las diferencias de la permeabilidad de las zonas de oclusión. Por ejemplo, sólo una pequeña región de un túbulo renal humano, conocida como rama ascendente gruesa, tiene zonas de oclusión permeables a iones magnesio (Mg^{2+}). Se cree que las hebras que contienen claudina de la rama ascendente gruesa poseen poros con permeabilidad selectiva para iones Mg^{2+}. Esta idea se apoya en el hallazgo de un miembro específico de la familia de las claudinas, la claudina 16, que se expresa sobre todo en la rama ascendente gruesa. La importancia de la claudina 16 en la función renal se reveló en estudios de pacientes que sufren una rara enfermedad caracterizada por niveles demasiado bajos de Mg^{2+} en sangre. Se observó que estos individuos padecen mutaciones en ambas copias del gen *claudina 16*. El nivel de Mg^{2+} en su sangre es bajo porque las zonas de oclusión que contienen la claudina anormal son impermeables al magnesio. Como resultado, este ion importante no se resorbe del túbulo y se excreta en la orina.

En 2002 se descubrió otra función relevante de las zonas de oclusión. Durante décadas se pensó que la impermeabilidad de la piel de los mamíferos al agua era propiedad de la capa externa cornificada de la piel (véase fig. 7-1) que contiene filamentos de proteína muy aglomerados y lípidos relacionados. Sin embargo, se descubrió que los ratones que carecen del gen para la claudina 1 morían poco después de nacer a causa de la deshidratación. La investigación más profunda reveló que las células en una de las capas más externas de la epidermis *normal* están conectadas entre sí mediante zonas de oclusión. Los animales que carecen del gen para claudina 1 fueron incapaces de desarrollar zonas de oclusión epidérmicas impermeables y, como resultado, sufrieron la pérdida descontrolada de agua.

Las zonas de oclusión también están presentes entre las células endoteliales que recubren las paredes de los capilares. Estas uniones son muy evidentes en el cerebro, donde ayudan a formar la *barrera hematoencefálica*, que impide el paso de sustancias de la corriente sanguínea al cerebro. Aunque es probable que los iones pequeños e incluso las moléculas de agua no puedan penetrar esta barrera, las células del sistema inmunológico pueden cruzar el endotelio a través de estas uniones. Se cree que dichas células envían una señal que abre la unión y permite que las células pasen. Aunque protege al cerebro contra solu-

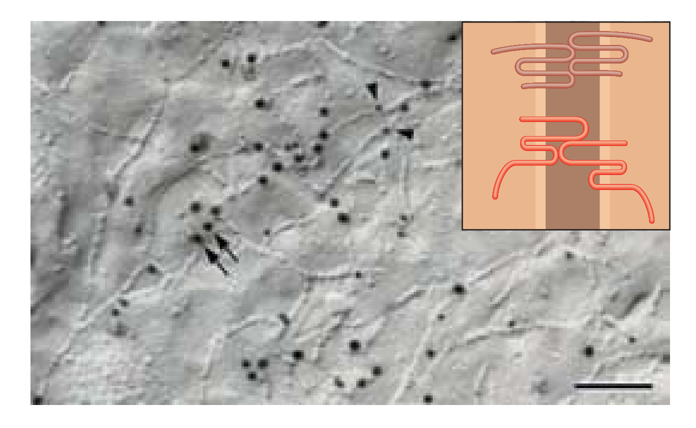


FIGURA 7-31 Composición molecular de las hebras de la zona de oclusión. Micrografía electrónica de una réplica de células por congelamiento y fractura que se había unido con otra mediante zonas de oclusión. Las caras de fractura se incubaron con dos tipos de anticuerpos marcados con oro. Las partículas de oro más pequeñas (puntas de flecha) revelan la presencia de moléculas de claudina, mientras que las partículas de oro más grandes (flechas) se refieren a ocludina. Estos experimentos demostraron que ambas proteínas están presentes en las mismas hebras de la zona de oclusión. La barra equivale a 0.15 μm. El recuadro muestra una posible configuración de las dos proteínas integrales de membrana cuando hacen contacto en su espacio intercelular. Tanto las claudinas (rojo) como la ocludina (pardo) cruzan la membrana cuatro veces. (MICROGRAFÍA DE MIKIO FURUSE, HIROYUKI SASAKI, KAZUSHI FUJIMOTO Y SHOICHIRO TSUKITA, J CELL BIOL 143:398, 1998. CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

tos indeseables, la barrera hematoencefálica también impide el acceso de fármacos al sistema nervioso central. Por consiguiente, uno de los objetivos principales de la industria farmacéutica es desarrollar agentes que abran en forma transitoria las zonas de oclusión del cerebro para permitir el paso de sustancias terapéuticas.

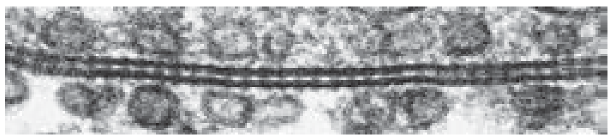
REVISIÓN ?

1. ¿Qué información brinda el análisis por congelamiento y fractura sobre la estructura de una unión que no puede obtenerse con el examen de cortes hísticos teñidos?
2. ¿Cómo contribuye la estructura de una zona de oclusión a su función?

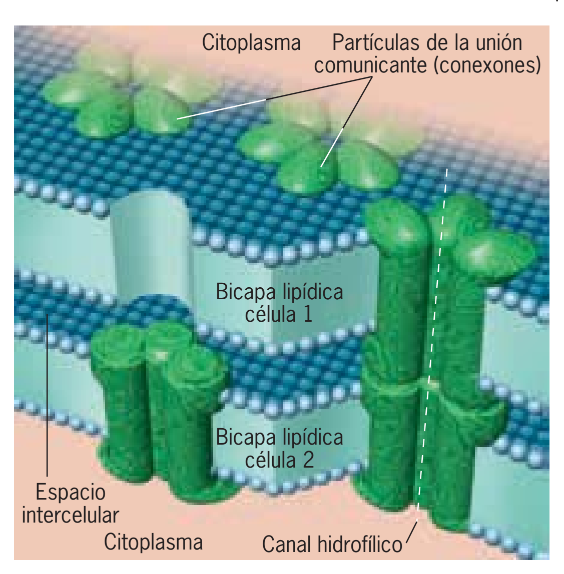
7.5 UNIONES COMUNICANTES Y PLASMODESMAS: MEDIACIÓN DE LA COMUNICACIÓN INTERCELULAR

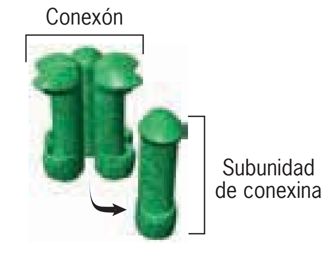
Las **uniones comunicantes** son sitios entre las células animales especializados para la comunicación intercelular. Las micrografías electrónicas revelan que las uniones comunicantes son sitios en los que las membranas plasmáticas de células adyacentes se aproximan de forma notoria una a la otra (hasta unos 3 nm), pero no establecen contacto directo. En lugar de ello, la brecha entre las células se cubre con hebras muy finas (fig. 7-32*a*) que en realidad son "tuberías" moleculares que pasan por las membranas plasmáticas adyacentes y se abren al citoplasma de las células contiguas (fig. 7-32*b*).

Las uniones comunicantes tienen una composición molecular simple; se componen sólo de una proteína integral de membrana llamada *conexina*. Las conexinas se aglomeran den-

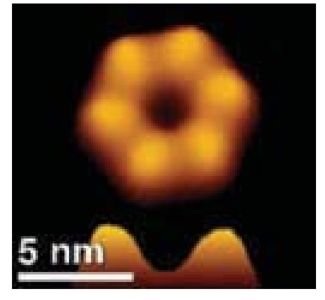


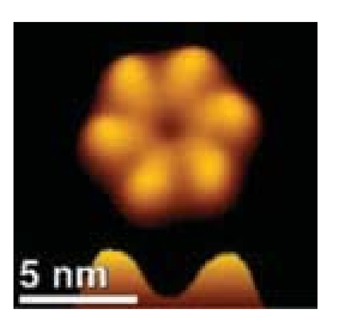
(*a*)



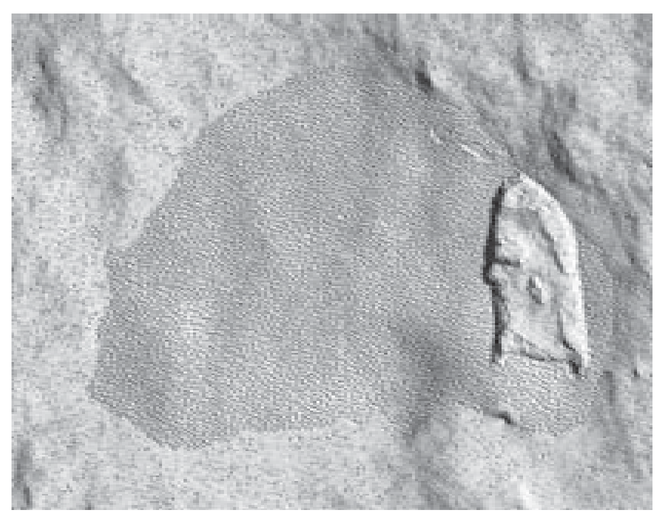


(*b*)





(*c*)



(*d*)

FIGURA 7-32 Uniones comunicantes. *a*) Micrografía electrónica de un corte a través de una unión comunicante, perpendicular al plano de las dos membranas adyacentes. Las "tuberías" entre las dos células se ven como cuentas electrodensas en las membranas plasmáticas yuxtapuestas. *b*) Modelo esquemático de una unión comunicante que muestra la disposición de seis subunidades de conexina para formar un conexón, el cual contiene la mitad del canal que conecta el citoplasma de las dos células adyacentes. Cada subunidad de conexina es una proteína integral con cuatro dominios transmembranosos. *c*) Imágenes de alta resolución obtenidas por microscopia óptica de la superficie extracelular de un conexón individual en las conformaciones abierta (izquierda) y cerrada (derecha). El cierre del conexón fue inducido por exposición a altas concentraciones de ion Ca^{2+}. *d*) Réplica por criofractura de una placa de unión comunicante, que muestra la gran cantidad de conexones y su alta concentración. (*A*, TOMADA DE CAMILLO PERACCHIA Y ANGELA F. DULHUNTY, J CELL BIOL. 70:419, 1976; CON AUTORIZACIÓN DEL TITULAR DEL COPYRIGHT, LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS; *C*, CORTESÍA DE GINA E. SOSINSKY; *D*, CORTESÍA DE DAVID ALBERTINI.)

tro de la membrana plasmática como un complejo de múltiples subunidades denominado **conexón**, que cruza la membrana (fig. 7-32*b*). Cada conexón se forma de seis subunidades de conexina dispuestas alrededor de una abertura central, o *anillo*, que mide cerca de 16 Å de diámetro en su superficie extracelular (fig. 7-32*c*).

Durante la formación de las uniones comunicantes, los conexones de las membranas plasmáticas de células adyacentes se unen con fuerza mediante interacciones extensas de los dominios extracelulares de las subunidades de conexina. Una vez alineados, los conexones de las membranas plasmáticas unidas forman canales intercelulares completos que conectan el citoplasma de una célula con el de su vecina (fig. 7-32*b*). Los canales se aglomeran en regiones específicas de la membrana, forman placas de uniones comunicantes que pueden visualizarse cuando la membrana se divide por el centro con la técnica de congelamiento y fractura (fig. 7-32*d*).

Como se explica en la sección Vías experimentales (véase *www.wiley.com/college/karp*), las uniones comunicantes son sitios de comunicación entre los citoplasmas de células adyacentes. La existencia de comunicación intercelular mediante uniones (GJIC) se revela mediante el paso de corrientes iónicas o tintes de bajo peso molecular, como la fluoresceína, de una célula a sus vecinas (fig. 7-33). Las uniones comunicantes de los mamíferos permiten la difusión de moléculas con masa molecular menor de unos 1 000 Da. Comparados con los canales iónicos tan selectivos que conectan a la célula con el medio externo (pág. 152), los canales de las uniones comunicantes son relativamente no selectivos. Así como los canales iónicos pueden abrirse o cerrarse, también se cree que los canales de las uniones comunicantes son controlados. Es probable que el cierre del canal esté controlado sobre todo por la fosforilación de subunidades de conexina. Es posible que el cierre también sea inducido por concentraciones anormalmente altas de Ca^{2+} (fig. 7-32*c*, derecha).

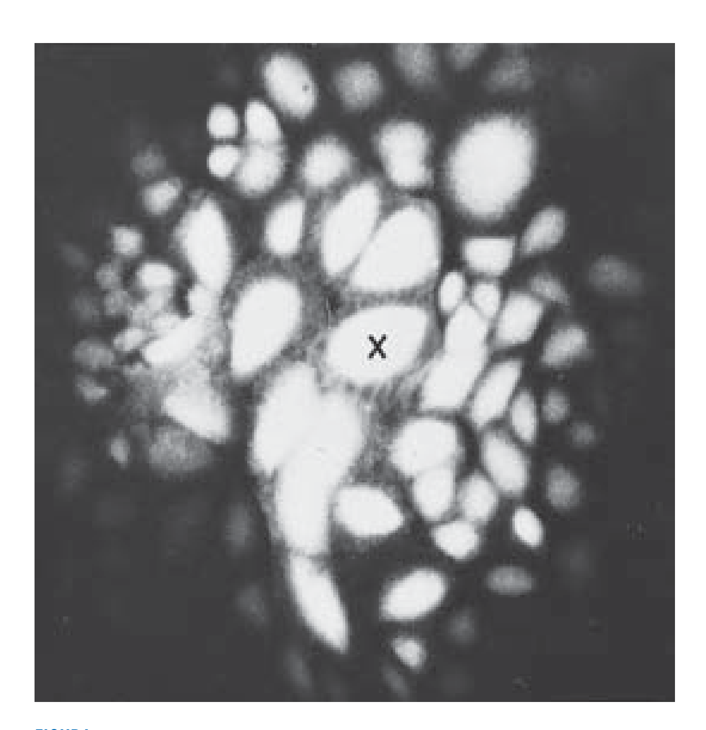


FIGURA 7-33 Resultados de un experimento que demuestra el paso de solutos de bajo peso molecular a través de las uniones comunicantes. Micrografía en campo oscuro que muestra el paso de fluoresceína de una célula (X) en la que se inyectó a las células circundantes. (TOMADA DE R. AZARNIA Y W. R. LOEWENSTEIN. J MEMB BIOL 6:378, 1971.)

En el capítulo 4 se explicó cómo las células del músculo esquelético se estimulan con sustancias liberadas de las puntas de las células nerviosas cercanas. La estimulación de la célula muscular cardiaca o lisa ocurre por un proceso diferente en el que intervienen las uniones comunicantes. La contracción del corazón de los mamíferos está estimulada por un impulso eléctrico generado en una pequeña región de músculo cardiaco especializado llamado *nodo sinoauricular*, que actúa como el marcapasos del corazón. El impulso se propaga con rapidez cuando una corriente de iones fluye por las uniones comunicantes de una célula miocárdica a otras, lo que hace que las células se contraigan en sincronía. De igual manera, el flujo de iones por las uniones comunicantes que conectan las células de músculo liso en la pared del esófago o el intestino permite la generación de ondas peristálticas coordinadas que se mueven por todo lo largo de la pared.[3]

Las uniones comunicantes ponen en contacto citoplásmico estrecho a muchas células de un tejido. Esto tiene consecuencias fisiológicas de importancia porque varias sustancias con intensa actividad reguladora, como el AMP cíclico y los fosfatos de inositol (cap. 15), son lo bastante pequeñas para caber por los canales de las uniones comunicantes. Como resultado, las uniones comunicantes tienen la capacidad de integrar las actividades de las células individuales de un tejido para que funcionen como unidad. Por ejemplo, si sólo unas cuantas células cerca de un vaso sanguíneo particular reciben el estímulo de una hormona, el estímulo puede transmitirse con rapidez a todas las células del tejido. Las uniones comunicantes también permiten que las células mantengan una cooperación metabólica al compartir metabolitos clave, como ATP, fosfatos de azúcares, aminoácidos y muchas coenzimas que son lo bastante pequeñas para pasar por estos canales intercelulares. Esto reviste especial importancia en tejidos que, como el cristalino del ojo, son avasculares (es decir, carecen de vasos sanguíneos).

Las conexinas (Cx), proteínas con las que se forman las uniones comunicantes, son miembros de una familia multigénica. Se han identificado cerca de 20 conexinas con distintas distribuciones en tejidos específicos. Los conexones formados por diferentes conexinas muestran diferencias en conductancia, permeabilidad y regulación. En algunos casos, los conexones de las células vecinas que se forman de conexinas diferentes pueden ensamblarse y formar canales funcionales, y en otros casos no sucede así. Estas diferencias en la compatibilidad pueden tener funciones relevantes en la promoción o prevención de la comunicación entre distintos tipos de células en un órgano. Por ejemplo, los conexones que unen las células miocárdicas se componen de conexina Cx43, mientras que los conexones que unen las células que forman el sistema de conducción eléctrica en el

[3] Como se explica en Vías experimentales en Internet, las uniones comunicantes también se forman entre las membranas presinápticas y postsinápticas de células nerviosas adyacentes en ciertas partes del cerebro, lo que permite la transmisión directa de impulsos nerviosos de una neurona a otra sin que sea necesaria la liberación de transmisores químicos.

corazón se forman de Cx40. Como estas dos conexinas forman conexones incompatibles, los dos tipos de células mantienen un aislamiento eléctrico entre sí, aunque conservan el contacto físico. Hay varios trastornos hereditarios relacionados con mutaciones en los genes que codifican conexinas. Las consecuencias de estos trastornos incluyen sordera, ceguera, anormalidades de la piel y degeneración nerviosa.

En los últimos años se ha descubierto un nuevo tipo de sistema de comunicación que consta de túbulos delgados y muy largos capaces de conducir proteínas de superficie celular y vesículas citoplásmicas de una célula a otra. A la fecha, estos *nanotúbulos de tunelización*, como se les llama, sólo se han observado entre células en cultivo (como en la figura 7-34), así que aún queda por ver si tienen un cometido fisiológico importante en el cuerpo.

Plasmodesmas

A diferencia de los animales, cuyas células establecen contactos estrechos entre sí, las células vegetales están separadas unas de otras por una barrera notable, la pared celular. Por lo tanto, no es sorprendente que las plantas carezcan de las moléculas de adhesión celular que se han descrito en este capítulo. Aunque las plantas no poseen las uniones especializadas que se observan en los tejidos animales, la mayoría de las células vegetales se conecta entre sí mediante **plasmodesmas**. Los plasmodesmas son canales citoplásmicos que pasan a través de las paredes celulares de células adyacentes. La figura 7-34*a*, *b* muestra un plasmodesma simple (no ramificado). Tales estructuras están recubiertas con membrana plasmática y casi siempre contienen una estructura central densa, el *desmotúbulo*, derivado del retículo endoplásmico liso de una de las dos células. Al igual que las uniones comunicantes entre las células animales, los plasmodesmas sirven como sitios de comunicación intercelular, ya que algunas sustancias pasan por el anillo que rodea al desmotúbulo.

Durante muchos años se pensó que los plasmodesmas eran impermeables a las moléculas que medían más de 1 kDa (1 000 daltones). Esta conclusión se basa en estudios en los que se inyectaron diferentes pigmentos en las células. Estudios más recientes sugieren que los plasmodesmas permiten el paso de moléculas mucho más grandes (hasta de 50 kDa) entre las células. A diferencia de las uniones comunicantes, cuyas tuberías tienen una abertura fija, el poro de los plasmodesmas es capaz de dilatarse. El primer esbozo de esta propiedad dinámica se obtuvo de estudios en la década de 1980 con virus vegetales que se diseminan de una célula a otra a través de los plasmodesmas. Se observó que los virus codificaban una *proteína de movimiento* que interactúa con la pared de los plasmodesmas y aumentaba el diámetro del poro. Los estudios posteriores revelaron que las células vegetales producen sus propias proteínas de movimiento que median el transporte de proteínas y moléculas de RNA de una célula a otra. Algunas de estas macromoléculas van a dar al sistema vascular de la planta, donde integran actividades a nivel de todo el individuo, como la producción de nuevas hojas y flores o la defensa contra patógenos. En la figura 7-35*c* se documenta el movimiento de una proteína (marcada con fluorescencia verde) desde un tipo de tejido vegetal (el estele), donde se le sintetizó, hasta un tejido adyacente (la endodermis). Se observa que la proteína se concentra en los núcleos esféricos de las células endodérmicas, donde actúa estimulando la transcripción génica.

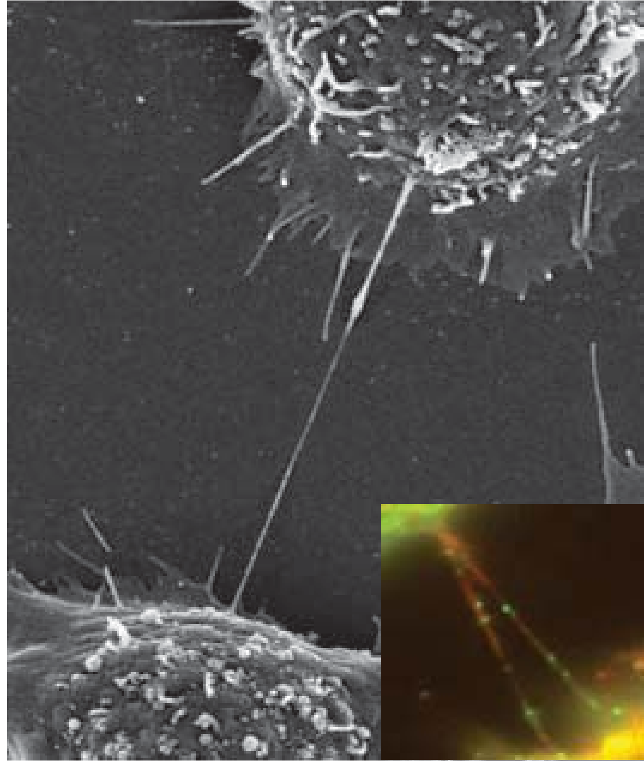


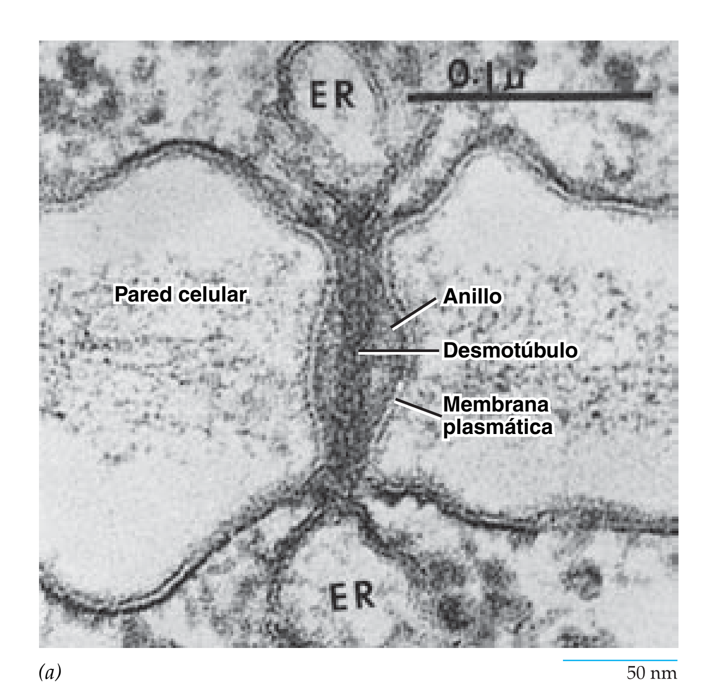
FIGURA 7-34 Nanotúbulos de tunelización. Micrografías electrónicas de barrido que muestran dos células neuroendocrinas en cultivo conectadas entre sí por una delgada prolongación tubular capaz de transportar materiales entre el citoplasma de las células vecinas. Estas prolongaciones, que apenas miden unos 100 nm de diámetro, son sostenidas por un "esqueleto" interno de actina. El recuadro muestra varias vesículas con tinción fluorescente captadas en el acto de desplazarse entre las dos células. (REIMPRESA CON PERMISO DE AMIN RUSTOM, ET AL., CORTESÍA DE HANS-HERMANN GERDES, SCIENCE 303:1007, 2004; COPYRIGHT 2004, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE.)

REVISIÓN ?

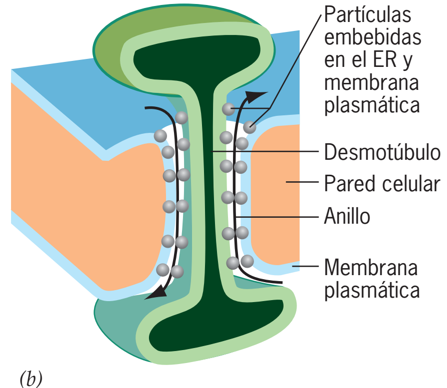
1. Compare la disposición de las proteínas integrales de membrana en una zona de oclusión con la de una unión comunicante.
2. ¿En qué son similares los plasmodesmas y las uniones comunicantes?, ¿en qué son distintos?, ¿esperaría que una proteína de tamaño moderado pasara por un plasmodesma?

7.6 PAREDES CELULARES

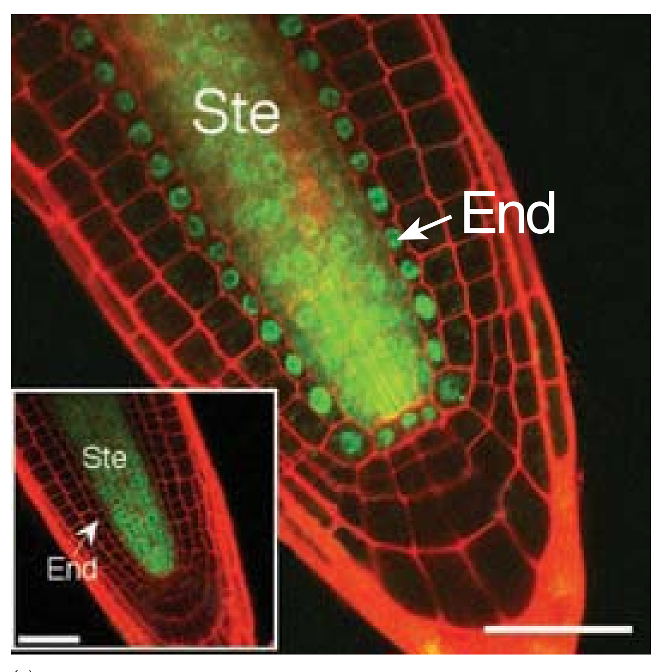
Como puede esperarse que una membrana plasmática de lípidos y proteínas de unos 10 nm de grosor ofrezca sólo una protección mínima al contenido celular, no es sorprenden-



(a) 50 nm



(b)



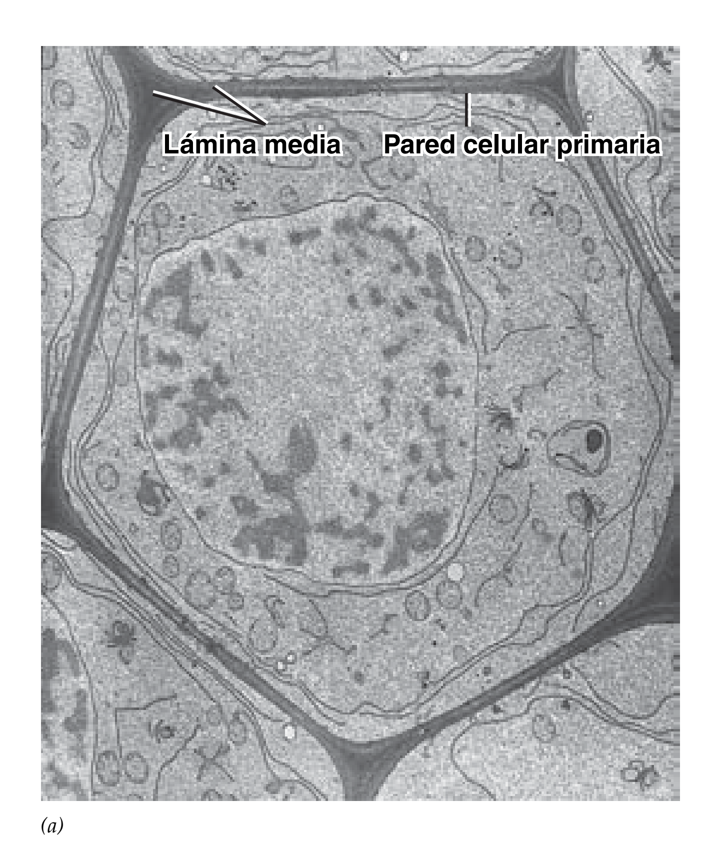
(c)

FIGURA 7-35 Plasmodesmas. *a*) Micrografía electrónica de un corte a través de un plasmodesma de un gametofito de helecho. Se ve que el desmotúbulo consiste en una membrana que se continúa con el retículo endoplásmico (ER) del citoplasma a ambos lados de la membrana plasmática. *b*) Esquema de un plasmodesma. Las flechas negras indican las vías que toman las moléculas a su paso por el anillo de una célula a otra. *c*) Ejemplo del movimiento de una proteína desde una célula hasta otra dentro de una raíz vegetal. El recuadro muestra la localización de las moléculas de RNA mensajero marcadas con fluorescencia (verde) que codifican una proteína llamada Shr. El mRNA se localiza dentro de las células del estele (Ste), que por tanto es el tejido en que esta proteína se sintetiza. La foto mayor muestra la localización de la proteína Shr marcada con fluorescencia (también verde), que se halla tanto dentro de las células del estele en que se sintetiza como en las células endodérmicas adyacentes (End) a las que ha llegado por medio de los plasmodesmos conectores. La proteína transportada se localiza dentro de los núcleos de las células endodérmicas en que actúa como un factor de transcripción. Barras: 50 μm y 25 μm (recuadro). (*A*, TOMADA DE LEWIS G. TILNEY, TODD J. COOKE, PATRICIA S. CONNELLY Y MARY S. TILNEY, J CELL BIOL 112:740, 1991; CON AUTORIZACIÓN DEL TITULAR DEL COPYRIGHT, LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS; *C*, REIMPRESA DE KEIJI NAKAJIMA, ET AL., CORTESÍA DE PHILIP N. BENFEY, NATURE 413:308, 2001; COPYRIGHT 2001 MACMILLAN MAGAZINES LTD.)

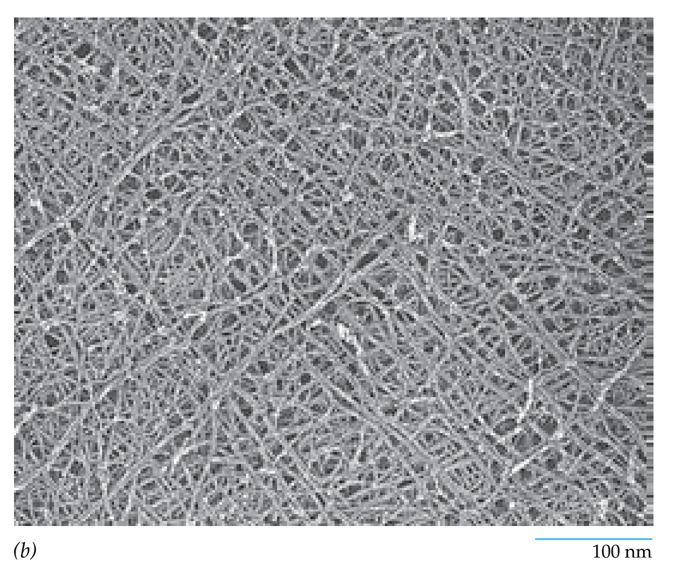
te que las células "desnudas" sean estructuras muy frágiles. Las células de casi todos los organismos distintos de los animales están encerradas en una envoltura protectora. Los protozoarios tienen una cubierta externa gruesa, mientras que las bacterias, hongos y plantas poseen **paredes celulares** distintivas. La descripción siguiente se limita a las paredes celulares de las plantas, que fueron las primeras estructuras celulares en observarse con un microscopio óptico (pág. 2).

Las paredes celulares vegetales tienen muchas funciones vitales. Como se explica en la página 150, las células vegetales desarrollan presión de turgencia que empuja contra la pared circundante. Como resultado, la pared da a la célula su forma poliédrica característica (fig. 7-36*a*). De hecho, un árbol sin paredes celulares podría compararse en todos los sentidos con una persona sin huesos. Las paredes celulares también protegen a la célula contra el daño por abrasión mecánica y por patógenos, además de mediar las interacciones entre las células. Como la ECM en la superficie de una célula animal, la pared de una célula vegetal también puede ser una fuente de señales que modifican las actividades de las células con las que entra en contacto.

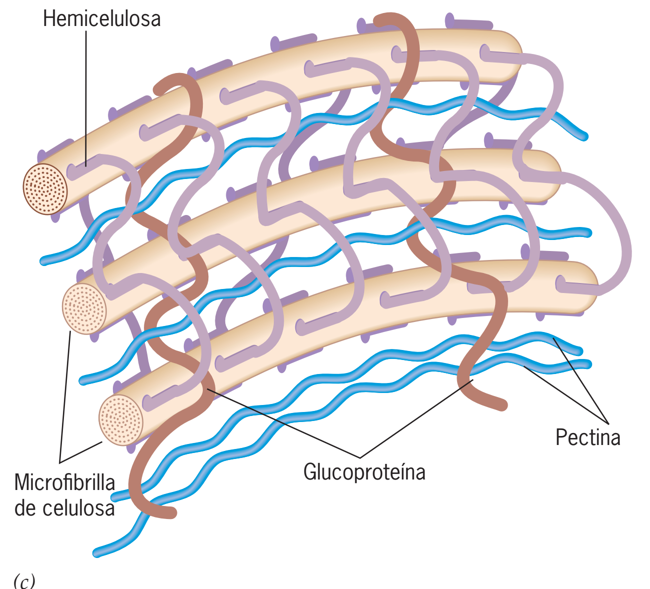
Muchas veces, las paredes celulares vegetales se comparan con materiales fabricados, como el concreto reforzado o la fibra de vidrio porque tienen elementos fibrosos incluidos en una matriz no fibrosa similar a una gelatina. La celulosa, cuya estructura se describió en la página 45, representa el componente fibroso de la pared celular y las proteínas y la pectina (descrita más adelante) forman la matriz. Las moléculas de celulosa se organizan en **microfibrillas** (fig. 7-36*b*, *c*) que confieren rigidez a la pared celular y brindan resistencia a las fuerzas de tensión (tracción). Cada microfibrilla mide unos 5 nm de diámetro y casi siempre se compone de 36 moléculas de celulosa orientadas en forma paralela entre sí y unidas mediante enlaces hidrógeno. Las paredes de muchas células vegetales se forman con capas en las que las microfibrillas de una capa se orientan a 90° de las fibras de capas adyacentes (fig. 7-36*b*).



(a)



(b)



(c)

FIGURA 7-36 La pared celular vegetal. *a*) Micrografía electrónica de una célula vegetal rodeada por su pared celular. La lámina media es una capa que contiene pectina, situada entre las paredes celulares adyacentes. *b*) Micrografía electrónica que muestra las microfibrillas de celulosa y enlaces cruzados de hemicelulosa de una pared celular de cebolla después de la extracción de los polímeros no fibrosos de pectina. *c*) Esquema de una pared celular vegetal generalizada. (*A*, CORTESÍA DE W. GORDON WHALEY; *B*, TOMADA DE M. C. MCCANN, B. WELLS Y K. ROBERTS, J CELL SCI 96:329, 1990. CON AUTORIZACIÓN DE THE COMPANY OF BIOLOGISTS LTD.)

Las moléculas de celulosa se polimerizan en la superficie celular. Las subunidades de glucosa se agregan al final de una molécula de celulosa en crecimiento mediante acción de una enzima de múltiples subunidades llamada *sintetasa de celulosa*. Las subunidades de la enzima están organizadas en un anillo de seis elementos, o roseta, que está incrustada en la membrana plasmática (fig. 7-37*a*, *b*). En cambio, los materiales de la matriz se sintetizan dentro del citoplasma (fig. 7-37*c*) y se trasladan a la superficie celular en vesículas secretoras. La matriz es altamente compleja, y se requieren cientos de enzimas para su síntesis y degradación. La matriz de la pared celular se compone de tres tipos de macromoléculas (fig. 7-36*c*):

1. Las **hemicelulosas** son polisacáridos ramificados cuya columna central consiste en un azúcar, como la glucosa, y cadenas laterales de otros azúcares, como la xilosa. Las moléculas de hemicelulosa se unen a las superficies de las microfibrillas de celulosa y se entreveran para formar una compleja red estructural.
2. Las **pectinas** son un grupo heterogéneo de polisacáridos con cargas negativas que contienen ácido galacturónico. Como los glucosaminoglucanos de las matrices celulares animales, las pectinas sostienen el agua y de esta manera forman una gelatina muy hidratada que llena los espacios entre los elementos fibrosos. Cuando una planta sufre el ataque de patógenos, los fragmentos de las pectinas liberadas de la pared desencadenan una reacción defensiva en la célula vegetal. La pectina purificada se usa en el mercado para suministrar consistencia gelatinosa a jaleas y mermeladas.
3. Las **proteínas**, cuyas funciones aún no se comprenden bien, son las mediadoras de las actividades dinámicas. Una clase, las expansinas, facilitan el crecimiento celular. Estas proteínas inducen la relajación localizada de la pared celular, lo que hace posible que la célula se alargue en ese sitio como respuesta a la presión de turgencia generada dentro de la célula. Las cinasas de proteínas relacionadas con la pared celular

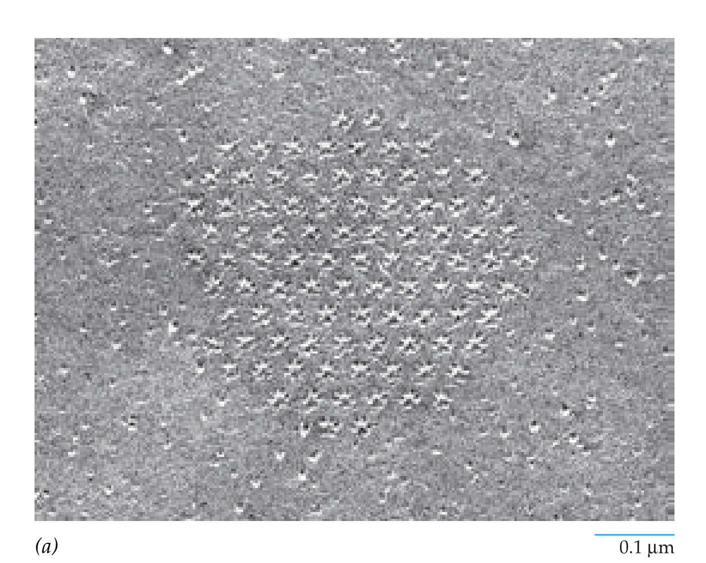
cruzan la membrana plasmática y se cree que transmiten señales de la pared celular al citoplasma.

Los porcentajes de estos materiales diversos en las paredes celulares son muy variables, dependen del tipo de planta, célula y etapa de la pared. Al igual que la matriz extracelular de los tejidos conjuntivos animales, las paredes de las células vegetales son estructuras dinámicas que pueden modificarse como respuesta a las condiciones cambiantes del ambiente.

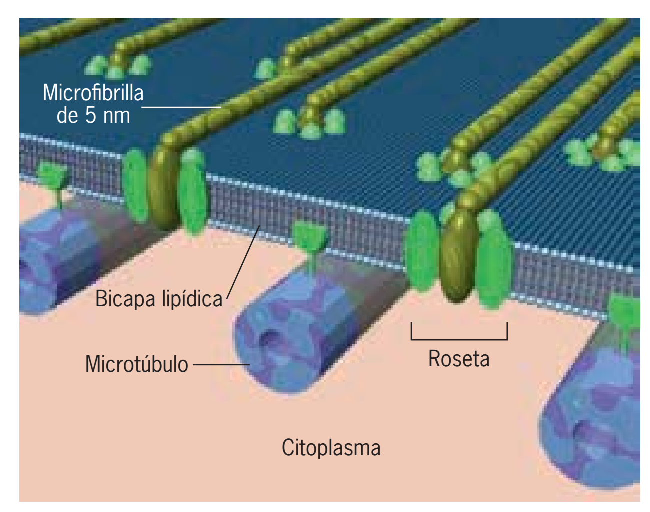
Las paredes celulares surgen como una **placa celular** delgada (descrita en la figura 14-38) que se forma entre las membranas plasmáticas de las células hijas recién formadas después de la división celular. La pared celular madura con la incorporación de materiales adicionales que se ensamblan dentro de la célula y se secretan hacia el espacio extracelular. Además de proporcionar soporte mecánico y protección contra los agentes extraños, la pared celular de una célula vegetal joven e indiferenciada debe ser capaz de crecer al ritmo del enorme crecimiento de la célula a la que rodea. Las paredes de las células en crecimiento se llaman **paredes primarias** y tienen la capacidad de extenderse, característica que no poseen las **paredes secundarias** más gruesas, que rodean a muchas células vegetales maduras. La transformación de pared celular primaria a secundaria ocurre cuando aumenta el contenido de celulosa de la pared y, en la mayoría de los casos, también se incorpora un polímero con fenol llamado *lignina*. Esta última suministra soporte estructural y es el principal componente de la madera. La lignina de las paredes de las células que conducen agua al xilema confiere el soporte necesario para desplazar agua por la planta.

REVISIÓN ?

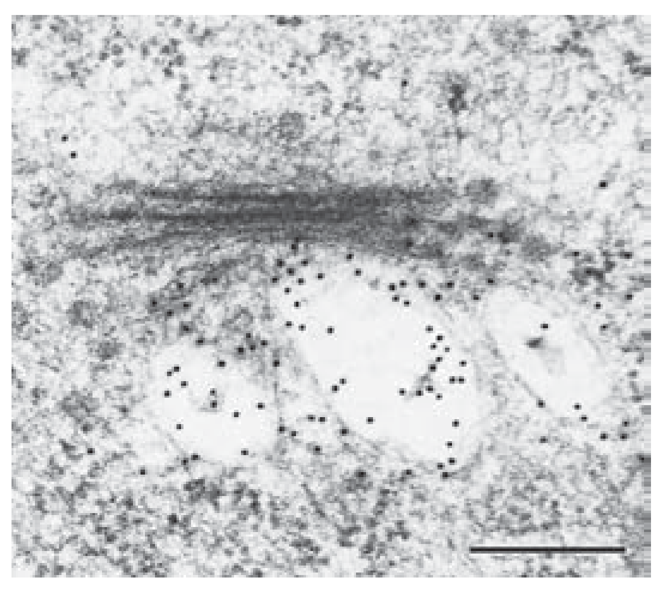
1. Describa los componentes que integran a las células vegetales y la función de cada uno en la estructura de la pared.
2. Diferencie entre la celulosa y la semicelulosa; una molécula de celulosa y una microfibrilla, una pared celular primaria y una pared celular secundaria.



(a)



(b)



(c)

FIGURA 7-37 Síntesis de las macromoléculas de la pared celular vegetal. *a*) Réplica por congelamiento y fractura de la membrana de una célula de alga. Se cree que las rosetas representan la enzima productora de celulosa (sintetasa de celulosa) situada dentro de la membrana plasmática. *b*) Un modelo de depósito de fibrillas de celulosa. Se presupone que cada roseta forma una sola microfibrilla que se relaciona a los lados con las microfibrillas de otras rosetas para formar una fibra más grande. Todo el conjunto de rosetas podría moverse en sentido lateral dentro de la membrana conforme lo empujan las moléculas de celulosa que se alargan. Los estudios sugieren que la dirección del movimiento de las rosetas de la membrana depende de los microtúbulos orientados que hay en el citoplasma cortical por debajo de la membrana plasmática (descrito en el cap. 9). *c*) Micrografía electrónica del aparato de Golgi de una célula de la tapa radicular periférica teñida con anticuerpos contra un polímero de ácido galacturónico, uno de los componentes principales de la pectina. Como la hemicelulosa, este material se ensambla en el aparato de Golgi. Los anticuerpos se unieron con partículas de oro para hacerlos visibles como gránulos oscuros. La barra representa 0.25 µm. (*A*, TOMADA DE T. H. GIDDINGS JR., D. L. BROWER Y L. A. STAEHELIN, J CELL BIOL 84:332, 1980; *C*, TOMADA DE MARGARET LYNCH Y L. A. STAEHELIN, J CELL BIOL 118:477, 1992. TODAS CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

SINOPSIS

El espacio extracelular se extiende desde la superficie externa de la membrana plasmática y contiene diversos materiales secretados que influyen en el comportamiento celular. Los tejidos epiteliales descansan sobre una membrana basal, la cual consiste en una red delgada de materiales extracelulares entretejidos. Varios tipos de tejido conjuntivo, incluidos los tendones, cartílago y el estroma corneal, contienen una matriz extracelular expansiva que confiere sus propiedades características al tejido (pág. 240).

Los principales componentes de las matrices extracelulares incluyen colágenas, proteoglucanos y diversas proteínas, como la fibronectina y laminina. Cada una de las proteínas de la ECM tiene una construcción modular que se forma con dominios que contienen sitios de unión para los demás y para receptores en la superficie celular. Como resultado, estos diversos materiales extracelulares interactúan para formar una red entrelazada que se une con la superficie celular. Las colágenas son proteínas fibrosas muy abundantes que dan a la matriz extracelular la capacidad para resistir las fuerzas de tracción. Los proteoglucanos consisten en proteínas y glucosaminoglucanos y sirven como material de empaque amorfo que llena el espacio extracelular (pág. 242).

Las integrinas son receptores en la superficie celular que median las interacciones entre las células y el sustrato. Las integrinas son proteínas heterodiméricas integrales de la membrana cuyos dominios citoplásmicos interactúan con los componentes del citoesqueleto y cuyos dominios extracelulares poseen sitios de unión para varios materiales extracelulares. Los cambios internos dentro de una célula envían señales "de adentro-afuera" que inician la actividad de las integrinas para unión con su ligando. Esta activación se acompaña de un cambio drástico de la estructura de la integrina, de una conformación flexionada a una vertical. Por el contrario, la unión de un ligando extracelular con una integrina puede enviar señales de "afuera-adentro" que inician cambios en las actividades celulares (pág. 248).

Las células se unen con su sustrato por medio de especializaciones en la superficie celular como las adhesiones focales y los hemidesmosomas. Las adhesiones focales son sitios de unión donde la membrana plasmática contiene cúmulos de integrinas unidas con microfilamentos del citoesqueleto que contienen actina. Los hemidesmosomas son sitios de unión en los que la membrana plasmática posee cúmulos de integrinas que se conectan con la membrana basal en su superficie externa, y en forma indirecta se unen con los filamentos intermediarios con queratina de la superficie interna. Ambos tipos de adhesiones también son sitios de posible señalización celular (pág. 252).

La adhesión de las células entre sí está mediada por varias familias distintas de proteínas integrales de membrana, incluidas selectinas, integrinas, caderinas y miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF). Las selectinas se unen con conjuntos específicos de grupos carbohidrato que sobresalen de las superficies de otras células y median las interacciones transitorias dependientes de calcio entre los leucocitos circulantes y las paredes de los vasos sanguíneos en sitios de inflamación y coagulación. Las moléculas de adhesión celular de la IgSF median la adhesión intercelular independiente del calcio. Una proteína de la IgSF en una célula puede interactuar con una integrina o con la misma proteína o una distinta de la IgSF que se proyecta de otra célula. Las caderinas median la adhesión intercelular dependiente de calcio mediante la unión con la misma especie de caderina en la célula opuesta, lo que facilita la formación de tejidos formados por tipos similares de células (pág. 254).

Las adhesiones fuertes entre las células se facilitan por la formación de uniones adherentes especializadas y desmosomas. Las uniones adherentes rodean a una célula cerca de su superficie apical, lo que permite el contacto entre la célula y todas sus vecinas. Las membranas plasmáticas de las uniones adherentes contienen conjuntos de caderinas que se unen mediante proteínas intermediarias con los filamentos de actina del citoesqueleto. Los desmosomas son parches que se forman entre las células y se caracterizan por placas citoplásmicas densas en las superficies internas de las membranas. Los desmosomas son sitios con concentración de caderinas, las cuales se unen mediante proteínas intermediarias con los filamentos intermediarios que forman curvas por las placas citoplásmicas (pág. 260).

Las zonas de oclusión son sitios especializados de contacto que bloquean la difusión de solutos entre las células en un epitelio. Un corte transversal a través de una zona de oclusión muestra que las superficies externas de las células adyacentes entran en contacto directo en puntos intermitentes. El examen de las membranas con la técnica de congelamiento y fractura muestra que los sitios contienen hileras de partículas alineadas que forman cadenas dentro de las membranas plasmáticas de células adyacentes (pág. 264).

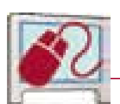
Las uniones de comunicantes y los plasmodesmas son sitios especializados de comunicación entre células adyacentes en animales y plantas, respectivamente. Las membranas plasmáticas de una unión comunicante contienen canales formados por un conjunto hexagonal de subunidades de conexina que constituyen un conexón. Estos canales conectan el citoplasma de una célula con el de la célula adyacente. El canal central de un conexón posibilita la difusión directa de sustancias de hasta 1 000 Da entre las células. El paso de corrientes iónicas por las uniones comunicantes tiene un papel central en muchos procesos fisiológicos, incluida la extensión de la excitación en el tejido muscular cardiaco. Los plasmodesmas son canales citoplásmicos cilíndricos que se extienden entre células vegetales adyacentes directamente a través de la pared celular intermedia. En condiciones normales, estos canales permiten el paso libre de moléculas de soluto de unos 1 000 Da, pero pueden dilatarse por efecto de proteínas específicas para permitir el paso de macromoléculas (pág. 266).

Las células vegetales están rodeadas por una pared celular compleja formada por diversos materiales secretados que suministran soporte mecánico y protegen a la célula de influencias dañinas. Las microfibrillas de celulosa, compuestas por haces de moléculas de celulosa secretadas por enzimas que están dentro de la membrana plasmática, proporcionan rigidez y fuerza tensil. Las moléculas de hemicelulosa forman enlaces cruzados con las fibras de celulosa, en tanto las pectinas un gel con muchos enlaces cruzados que rellena los espacios entre los elementos fibrosos de la pared celular. Al igual que las matrices extracelulares de las células animales, las paredes de las células vegetales son estructuras dinámicas que pueden modificarse como respuesta a las condiciones cambiantes del ambiente (pág. 268).

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. Muchas veces la adhesión celular puede bloquearse in vitro si se tratan las células con agentes específicos. ¿Cuáles de las siguientes sustancias se esperaría que interfirieran con las adhesiones celulares que median las selectinas y las moléculas L1? Las sustancias son tripsina, que digiere proteínas; un péptido que contiene RGD; neuraminidasa, que elimina el ácido siálico de un oligosacárido; colagenasa, que digiere colágena; hialuronidasa, que digiere el ácido hialurónico; EGTA, que se une con los iones Ca^{2+} del medio.

2. ¿Qué sustancia agregaría a un platillo de cultivo para bloquear la migración de las células de la cresta neural?, ¿cuál para el bloqueo de la adhesión de fibroblastos al sustrato?
3. Los ratones que carecen de un gen para la fibronectina no sobreviven después de la etapa embrionaria temprana. Mencione dos procesos que podrían estar afectados en estos embriones.
4. Asúmase que encuentra que la molécula A, que tiene una masa molecular de 1 500 Da, pudo penetrar los canales de una unión comunicante, pero la molécula B, cuya masa molecular es de sólo 1 200 Da, no pudo difundirse entre las mismas células. ¿Cuál es la diferencia que podrían tener estas moléculas que explique tales resultados?
5. ¿Qué similitudes hay en la construcción de las matrices extracelulares de los animales y las paredes celulares de las plantas?
6. Se ha observado que dos enfermedades autoinmunitarias diferentes se manifiestan por la formación de vesículas en la piel; en una se producen anticuerpos contra un componente de los hemidesmosomas y en la otra se producen anticuerpos contra un componente de los desmosomas. ¿Por qué cree que estos dos trastornos tengan síntomas similares?
7. ¿Cuál de las diversas moléculas que median la adhesión celular tiene más probabilidad de ser la causa del tipo de selección demostrada por las células de la figura 7-20?, ¿por qué?, ¿cómo probaría su conclusión?
8. La hormona foliculoestimulante (FSH) es una hormona hipofisaria que actúa sobre las células foliculares del ovario para iniciar la síntesis de AMP cíclico, el cual estimula varios cambios metabólicos. En condiciones normales, la FSH no tiene efecto sobre las células de músculo cardiaco. Sin embargo, cuando las células foliculares ováricas y las células miocárdicas crecen juntas en un cultivo mixto, se observa que varias células miocárdicas se contraen después de la adición de FSH al medio. ¿Cómo podría explicarse esta observación?
9. ¿Por qué cree que las células animales son capaces de sobrevivir sin los tipos de paredes celulares que se encuentran en casi cualquier otro grupo de organismos?
10. ¿Por qué se esperaría que el descenso de la temperatura del medio en el cual crecen las células afectara su capacidad para formar uniones comunicantes entre sí?
11. Ciertas uniones celulares se forman como cinturones, mientras que otras crean parches discretos. ¿Cómo se relacionan estos dos tipos de disposiciones estructurales con las funciones de las uniones respectivas?
12. Proponga algún mecanismo que explique por qué el virus del mosaico del tabaco pudo alterar la permeabilidad de un plasmodesma. ¿Cómo podría probar su propuesta?
13. Un tipo de célula de vertebrado que al parecer carece de integrinas es el eritrocito (glóbulo rojo). ¿Es de sorprender esto?, ¿por qué?



SITIO EN INTERNET www.wiley.com/college/karp

Las animaciones y los videos indicados en este capítulo pueden visitarse en el sitio de Cell and Molecular Biology de Karp en Internet. También hallará todas las respuestas a las preguntas analíticas recién planteadas, autoexámenes que le ayudarán a prepararse para los exámenes, y vínculos con fascinantes recursos. La sección lecturas adicionales que sigue se amplía en el sitio en Internet.

LECTURAS ADICIONALES

Anderson, J. M. et al. 2004. Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16:140–145.

Arnaout, M. A. et al. 2005. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:381–410.

Burridge, K. 2006. A break in the chain? *Nature* 440:38–39. [uniones adherentes.]

Calderwood, D. A. 2004. Integrin activation. *J. Cell. Sci.* 177:657–666.

Comoglio, P. M. & Trusolino, L. 2005. Cancer: the matrix is now in control. *Nature Med.* 11:1156–1159.

Cosgrove, D. J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6:850–861.

Fullwood, N. J. 2004. Collagen fibril orientation and corneal curvature. *Struct.* 12:169–170.

Furuse, M. & Tsukita, S. 2006. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol.* 16:181–188.

Getsios, S., et al. 2004. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 5:271–281.

Gumbiner, B. M. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 6:622–634.

Iozzo, R. V. 2005. Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 6:646–656.

Kottke, M. D. et al. 2006. The desmosome: cell science lessons from human diseases. *J. Cell Sci.* 119:797–806.

Leckband, D. 2004. Nanomechanics of adhesion proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14:524–530.

Lecuit, T. 2005. Adhesion remodeling underlying tissue morphogenesis. *Trends Cell. Biol.* 15:34–42.

Lloyd, C. 2006. Microtubules make tracks for cellulose. *Science* 312:1482–1483.

Myllyharju, J. & Kivirikko, K. I. 2004. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Gen.* 20:33–41.

Näthke, I. S. & Nelson, W. J., eds. 2005. Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:#5.

Sasaki, T. et al. 2004. Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J. Cell Biol.* 164:959–963.

Somerville, C. et al. 2004. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* 306:2206–2211.

Turksen, K. & Troy, T.-C. 2004. Barriers built on claudins. *J. Cell Sci.* 117:2435–2447.

Wells, W. A. 2005. Perspectives on the discovery of cell-cell junctions. *J. Cell. Biol.* 168:989 & 169:378.

CAPÍTULO 8

Sistemas de membrana citoplásmica: estructura, función y tránsito en la membrana

Bajo el microscopio óptico, el citoplasma de las células vivas se observa como una estructura relativamente vacía. Sin embargo, incluso antes del inicio del siglo XX, el examen de cortes teñidos de tejidos animales sugirió la existencia de una extensa red de membranas dentro del citoplasma. No obstante, fue hasta el desarrollo del microscopio electrónico en el decenio de 1940 cuando los biólogos empezaron a identificar la diversa disposición de las estructuras limitadas por membranas presentes en el citoplasma de la mayoría de las células eucariotas. Estos primeros microscopistas electrónicos vieron vesículas limitadas por membranas de diámetros variables que contenían material con diferente densidad electrónica, canales largos delimitados por membranas que se irradiaban por el citoplasma para formar una red interconectada de canales y sacos aplanados delimitados por membranas llamadas *cisternas.*

A partir de estos primeros estudios con el microscopio electrónico y las investigaciones bioquímicas que siguieron se hizo evidente que las células eucariotas se subdividían en diferentes compartimientos delimitados por barreras de membrana. A medida que se examinaron más tipos de células, resultó aparente que estos compartimientos membranosos en el citoplasma formaban organelos que podían identificarse en diversas células,

Micrografía electrónica de barrido con color artificial de un neutrófilo humano, un tipo de leucocito, que ingiere varias bacterias por el proceso de fagocitosis. Los neutrófilos son componentes esenciales de la inmunorreacción innata contra los patógenos. (TOMADA DE SCOTT D. KOBAYASHI, ET AL., PORTADA DE PNAS, VOL. 100, NÚM. 19, 2003, CORTESÍA DE FRANK R. DELEO.)

desde levaduras hasta plantas y animales. La extensión en la que el citoplasma de una célula eucariota está ocupado por estructuras membranosas se ilustra en la micrografía electrónica de una célula radicular del maíz en la figura 8-1. Como se advierte en las páginas siguientes, cada uno de estos organelos contiene un complemento particular de proteínas y está especializado en actividades específicas. Por lo tanto, tal y como una casa o un restaurante se dividen en estancias especializadas en las que pueden realizarse diferentes actividades independientes unas de otras, el citoplasma de una célula se divide en compartimientos membranosos especializados por razones análogas. Al examinar las micrografías de este capítulo hay que tener presente que estos organelos citoplásmicos pueden parecer estructuras estables, como las habitaciones de una casa o restaurante, pero de hecho son compartimientos dinámicos con un flujo continuo.

En este capítulo se examinan la estructura y funciones del retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, endosomas, lisosomas y vacuolas. Considerados en conjunto, estos organelos forman un **sistema de endomembrana** en el que los componentes individuales funcionan como parte de una unidad coordinada. (Mitocondrias y cloroplastos no son parte de este sistema interconectado y fueron los temas de los capítulos 5 y 6. En la actualidad existen indicios de que los peroxisomas, que se expusieron en el capítulo 6, tienen un origen doble. Como lo indican las micrografías que abren este capítulo, es probable que los elementos básicos de la membrana limitante surjan del retículo endoplásmico, pero la mayor parte de las proteínas de membrana y las proteínas internas solubles son tomadas del citosol, como se describe en la sección 8.9.)

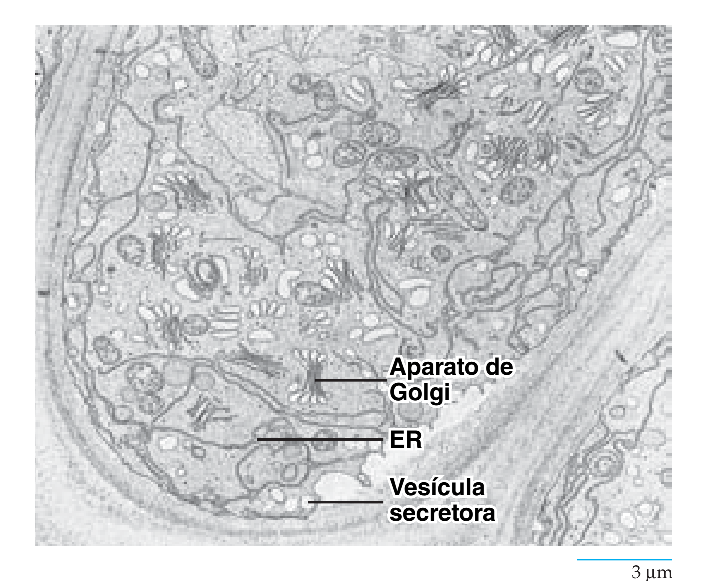


FIGURA 8-1 Compartimientos del citoplasma unidos a la membrana. El citoplasma de esta célula de la tapa radicular de una planta de maíz contiene un conjunto de organelos unidos a la membrana cuya estructura y función se examinan en este capítulo. Como resulta evidente en esta micrografía, la superficie combinada de las membranas citoplásmicas es muchas veces mayor que la membrana plasmática circundante. (CORTESÍA DE HILTON H. MOLLENHAUER.)

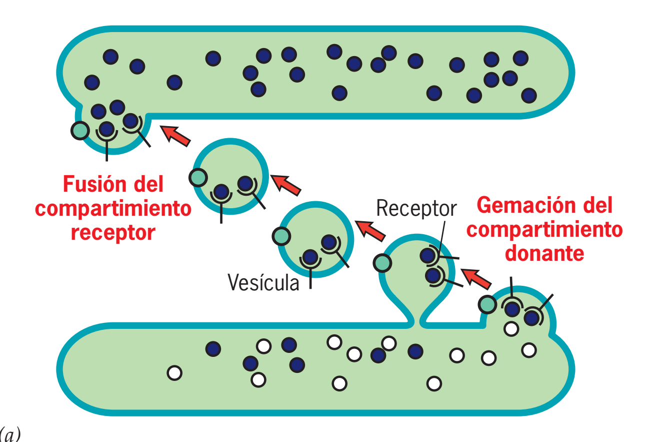
8.1 REVISIÓN DEL SISTEMA ENDOMEMBRANOSO

Los organelos del sistema de endomembrana son parte de una red dinámica integrada en la que los materiales se envían y regresan de una parte de la célula a otra. Casi en su totalidad, los materiales se trasladan entre los organelos, por ejemplo del aparato de Golgi a la membrana plasmática, en pequeñas **vesículas de transporte** limitadas por membrana que se desprenden de un compartimiento donante de membrana (fig. 8-2*a*).[1] Las vesículas de transporte se mueven por el citoplasma en forma dirigida, a menudo tiradas por proteínas motoras que operan sobre rieles formados por microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto (véase fig. 9-1*a*). Cuando llegan a su destino, las vesículas se fusionan con la membrana del compartimiento receptor, el cual recibe el cargamento soluble de la vesícula así como su envoltura membranosa (fig. 8-2*a*). Los ciclos repetidos de desprendimiento y fusión trasladan diversos materiales por los numerosos trayectos que cruzan la célula.

Ya se han identificado distintas vías a través del citoplasma y se ilustran en la revisión que se muestra en la figura 8-2*b*. Se puede distinguir una **vía biosintética** en la que se sintetizan proteínas en el retículo endoplásmico, se modifican a su paso por el aparato de Golgi y se transportan del aparato de Golgi a varios destinos, como la membrana plasmática, un lisosoma o una gran vacuola en una célula vegetal. Esta ruta también se conoce como la **vía secretora**, ya que muchas de las proteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico (así como los polisacáridos complejos producidos en el aparato de Golgi, página 296) se descargan (**secretan**) de la célula. Las actividades secretoras de las células pueden dividirse en dos tipos: constitutivas y reguladas (fig. 8-2*b*). Durante la **secreción constitutiva**, los materiales se transportan en vesículas secretoras de los sitios donde se producen para descargarse en el espacio extracelular en forma continua. La mayor parte de las células lleva a cabo secreción constitutiva, un proceso que contribuye no sólo a la formación de la matriz extracelular (sección 7.1), sino también a la formación de la membrana plasmática misma. Durante la **secreción regulada**, los materiales se almacenan en paquetes delimitados por membrana y se descargan sólo como respuesta a un estímulo apropiado. La secreción regulada ocurre, por ejemplo, en las células endocrinas que liberan hormonas, en las células de los ácinos pancreáticos que liberan enzimas digestivas y en las células nerviosas que liberan neurotransmisores. En algunas de estas células, los materiales que se secretan se almacenan en grandes **gránulos secretores** densos y delimitados por membrana (véase fig. 8-3).

Proteínas, lípidos y polisacáridos complejos se transportan por la célula mediante la vía biosintética o secretora. Esta primera parte del capítulo se enfoca en la síntesis y transporte de proteínas, como se resume en la figura 8-2*b*. Durante la

[1] El término "vesícula" se refiere a un portador de forma esférica. El cargamento también puede trasladarse en portadores irregulares o tubulares limitados por membrana. Por razones de sencillez, en general se hará referencia a los portadores como "vesículas", aunque hay que tener en mente que no siempre son esféricos.



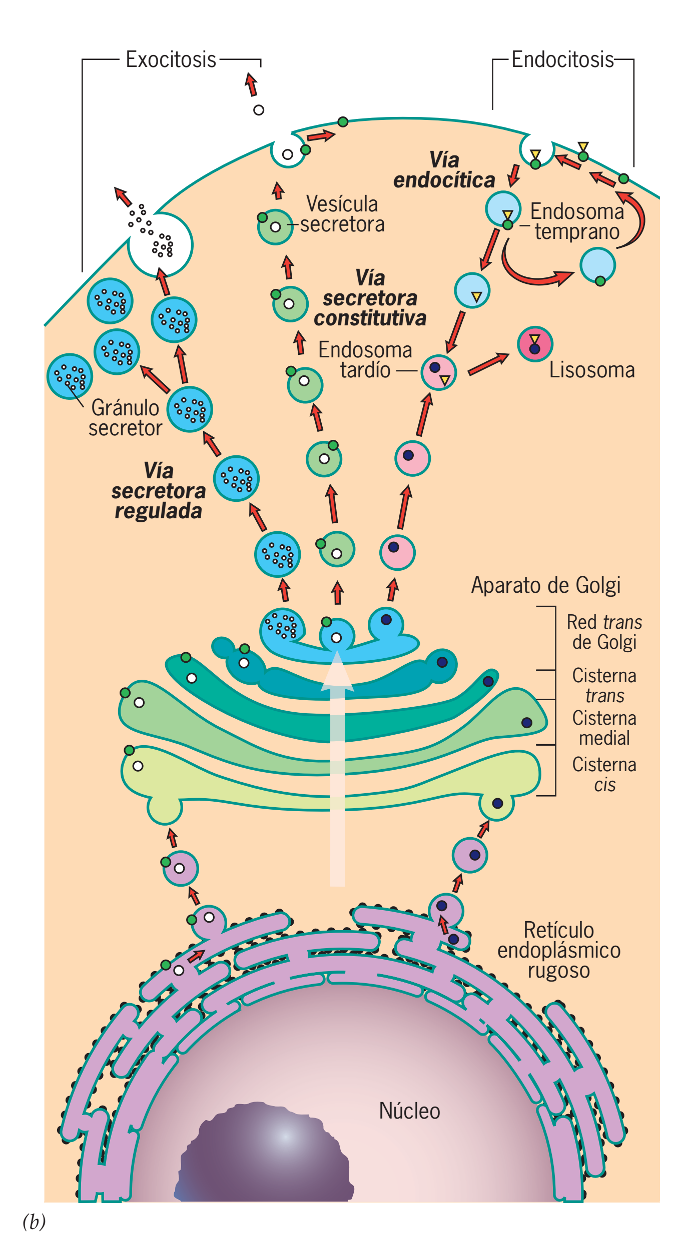


FIGURA 8-2 Revisión de las vías biosintética/secretora y endocítica que unen las endomembranas en una red dinámica interconectada. *a*) Esquema que ilustra el proceso de transporte en vesícula por el cual se trasladan los materiales de un compartimiento donante a uno receptor. Las vesículas se forman mediante gemación de la membrana y durante el proceso las proteínas de la membrana donante se incorporan en la membrana de la vesícula y las proteínas solubles del compartimiento donante se unen con receptores específicos. Cuando la vesícula de transporte se fusiona luego con otra membrana, las proteínas de la vesícula se vuelven parte de la membrana receptora y las proteínas solubles quedan secuestradas en la luz del compartimiento receptor. *b*) Los materiales siguen la vía biosintética (o secretora) del retículo endoplásmico, a través del aparato de Golgi y llegan a varios sitios, como los lisosomas, endosomas, vesículas secretoras, gránulos secretores, vacuolas y la membrana plasmática. Los materiales siguen la vía endocítica de la superficie celular hacia el interior mediante endosomas y lisosomas, donde casi siempre se degradan por acción de las enzimas lisosómicas.

explicación se consideran varias clases diferentes de proteínas. Éstas incluyen proteínas solubles que se expulsan de la célula, proteínas integrales de varias membranas mostradas en la figura 8-2*b* y proteínas solubles que residen dentro de varios compartimientos limitados por endomembranas (p. ej., enzimas lisosómicas). Mientras que los materiales salen de la célula por la vía secretora, la vía endocítica opera en sentido contrario. A través de la **vía endocítica**, los materiales se mueven de la superficie externa de la célula a los compartimientos, como los endosomas y lisosomas, que se localizan dentro del citoplasma (fig. 8-2*b*).

El movimiento de las vesículas y su contenido en las diversas vías de una célula es análogo al movimiento de camiones que llevan distintos tipos de cargamento por las autopistas de una ciudad. Ambos tipos de transporte requieren *patrones de tránsito* definidos para asegurar que los materiales se entreguen de manera precisa en los sitios adecuados. Por ejemplo, el tránsito de proteínas dentro de la célula de una glándula salival requiere que las proteínas del moco salival, que se sintetizan en el retículo endoplásmico, se dirijan de manera *específica* a los gránulos secretores, mientras que las enzimas lisosómicas, que también se producen en el retículo endoplásmico, se dirigen a un lisosoma. Asimismo los diferentes organelos contienen proteínas integrales de distintas membranas. Por consiguiente, las proteínas de membrana también deben dirigirse a organelos particulares, como un lisosoma o cisterna de Golgi. Estos tipos de cargamento (proteínas secretadas, enzimas lisosómicas y proteínas de membrana) se dirigen a sus destinos celulares apropiados en virtud de sus "domicilios" específicos o *señales clasificadoras* que están codificadas en la secuencia de aminoácidos de las proteínas o en los oligosacáridos unidos. En las membranas de las vesículas que se desprenden hay receptores específicos que reconocen las señales clasificadoras (fig. 8-2*a*), lo que asegura que la proteína se transporte al destino apropiado. En mayor medida, la maquinaria encargada de impulsar este complejo sistema de distribución consta de proteínas solubles que son *reclutadas* por superficies membranosas específicas, donde realizan sus actividades designadas. En el transcurso de este capítulo se intenta comprender por qué una proteína es reclutada por ejemplo por

el retículo endoplásmico mientras que otra podría ser reclutada por una región específica del aparato de Golgi.

En los últimos 30 años se han hecho grandes avances en el mapeo de los patrones de tránsito de las células eucariotas, la identificación de domicilios y receptores específicos que regulan el flujo del tránsito y la disección de los mecanismos que asegura que los materiales se entreguen en los sitios correctos de la célula. Éstos temas se tratan con detalle en las páginas siguientes. Las proteínas motoras y los elementos del citoesqueleto, que tienen papeles clave en los movimientos de las vesículas de transporte y otras endomembranas se describen en el capítulo siguiente. El estudio de éstas se inicia con la discusión de algunas de las formas experimentales más importantes que condujeron a la comprensión actual de este tema.

REVISIÓN

1. Compare y contraste la vía biosintética con la vía endocítica.
2. ¿Cómo se dirigen las proteínas particulares a los compartimientos subcelulares específicos?

8.2 ALGUNAS APROXIMACIONES AL ESTUDIO DE LAS ENDOMEMBRANAS

Los estudios iniciales con el microscopio electrónico proporcionaron a los biólogos un retrato detallado de la estructura celular, pero suministraron poca información sobre las funciones de los componentes que observaban. Para identificar las funciones de los organelos citoplásmicos fue necesario el desarrollo de técnicas nuevas y la ejecución de experimentos innovadores. Los primeros esfuerzos en estas áreas se vieron recompensados con el premio Nobel en 1974 para tres biólogos celulares: Christian De Duve, de la *Universidad de Lovaina* en Bélgica, y Albert Claude y George Palade, de la *Rockefeller University.* Las técnicas experimentales descritas en las secciones siguientes resultaron muy útiles para establecer la base de conocimiento sobre la cual se finca la investigación actual de los organelos citoplásmicos.

Información obtenida de la autorradiografía

Entre los cientos de células diferentes del cuerpo, las células acinares del páncreas tienen un sistema de endomembrana en particular extenso. La función principal de estas células es la síntesis y secreción de enzimas digestivas. Después de la secreción pancreática, estas enzimas se envían al intestino delgado mediante conductos, donde degradan el alimento ingerido. ¿En qué sitio de las células acinares pancreáticas se sintetizan las proteínas secretoras y cómo llegan a la superficie de las células de las que se expulsan? Estas preguntas son difíciles de responder porque todos los pasos del proceso de secreción ocurren al mismo tiempo dentro de la célula. Para seguir los pasos de un solo ciclo de principio a fin, es decir, desde la síntesis de la proteína secretora a su salida de la célula, James Jamieson y George Palade utilizaron la técnica de la **autorradiografía**.

Como se describe con detalle en el capítulo 18, la autorradiografía es un medio para visualizar los procesos bioquímicos al permitir que el investigador determine la localización de materiales con marca radiactiva dentro de una célula. En esta técnica, los cortes hísticos con los isótopos radiactivos se cubren con una capa delgada de emulsión fotográfica, la cual se expone por la radiación que emana de los radioisótopos del tejido. Los sitios de las células que contienen radiactividad se revelan al microscopio por los granos de plata de la emulsión que se aplicó encima (fig. 8-3).

Para reconocer los puntos en los que se sintetizan las proteínas secretoras, Palade y Jamieson incubaron fragmentos de tejido pancreático en una solución que contenía aminoácidos radiactivos durante un periodo corto. Durante este lapso, las células vivas captaron estos aminoácidos marcados y los incorporaron en las enzimas digestivas que se sintetizaban en los ribosomas. Los tejidos se fijaron y con la autorradiografía se identificó la localización de las proteínas que se habían sintetizado durante el breve periodo de incubación con aminoácidos marcados. Con esta técnica se descubrió el retículo endoplásmico como el sitio donde se sintetizan las proteínas secretoras (fig. 8-3*a*).

Para determinar la vía intracelular que siguen las proteínas secretoras desde el punto donde se sintetizan hasta el sitio donde se descargan, Palade y Jamieson realizaron un experimento adicional. Después de incubar el tejido por un breve periodo con aminoácidos radiactivos, lavaron el tejido para retirar el exceso de isótopos y transfirieron el tejido a un medio que contenía sólo aminoácidos no marcados. Un experimento de este tipo se llama *pulso-persecución*. El *pulso* se refiere a la incubación breve con radiactividad durante la cual los aminoácidos marcados se incorporan en la proteína. La *persecución* se refiere al lapso en que el tejido se expone al medio no marcado, un periodo durante el cual se sintetizan proteínas adicionales con aminoácidos sin marca. Cuanto mayor sea el tiempo de persecución, más lejos se desplazan las proteínas radiactivas producidas durante el pulso de su sitio de síntesis en la célula. Con esta técnica es posible seguir los movimientos de las moléculas recién sintetizadas mediante la observación de la onda de material radiactivo que se mueve por los organelos citoplásmicos desde un punto al siguiente hasta que se completa el proceso. La figura 8-3*b-d* resume los resultados de estos experimentos, que definieron por primera vez la vía biosintética (o secretora) y vincularon varios compartimientos membranosos que parecían inconexos en una unidad funcional integrada.

Información obtenida a partir de la proteína verde fluorescente

Para los experimentos con autorradiografías descritos en la sección anterior fue necesario que los investigadores examinaran cortes delgados de células diferentes que se fijaron en distintos momentos después de introducir una marca radiactiva. En los últimos años se desarrolló una nueva tecnología que permite a los investigadores seguir con sus propios ojos los movimientos de proteínas específicas mientras éstos ocurren dentro de una sola célula viva. Esta tecnología emplea un gen aislado de una medusa que codifica una pequeña proteína, la **proteína verde fluorescente (GFP)**, que emite una luz fluorescente de dicho color. Para usar esta técnica, el DNA (ácido desoxirribonucleico)

que codifica la GFP se fusiona con el DNA que codifica la proteína a estudiar y el DNA quimérico resultante (compuesto) se introduce en las células, las cuales pueden observarse al microscopio. Una vez dentro de una célula, el DNA quimérico expresa una proteína quimérica que consiste en GFP fusionada con el final de la proteína a estudiar. En la mayoría de los casos, la presencia de la GFP unida con el final de una proteína tiene poco o ningún efecto en el movimiento o función de esa proteína.

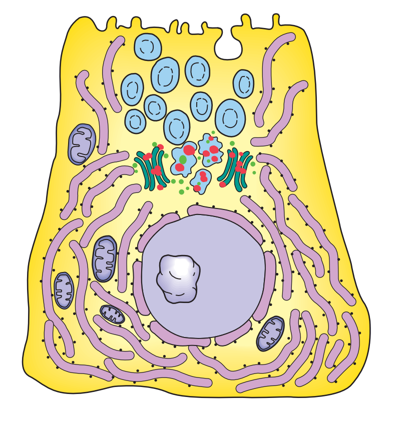
La figura 8-4 presenta un par de micrografías que muestran células que contienen proteína fusionada con GFP. En este caso, las células se infectaron con una cepa del virus de la estomatitis vesicular (VSV) en la que uno de los genes virales (*VSVG*) se fusionó con el gen *GFP*. Los virus son útiles en estos tipos de estudios porque convierten a las células infectadas en fábricas para producir una o varias proteínas virales, las cuales son transportadas igual que cualquier otro cargamento de proteína por la vía biosintética. Cuando una célula está infectada con el virus VSV, se producen cantidades masivas de la proteína VSVG en el retículo endoplásmico (ER). Después, las moléculas de VSVG viajan por el aparato de Golgi y se transportan a la membrana plasmática de la célula infectada, donde se incorporan en envolturas virales. Como en el experimento con pulso radiactivo y persecución, el uso de un virus permite a los investigadores seguir una onda relativamente sincrónica de movimiento de las proteínas, en este caso representada por una oleada de fluorescencia verde que se inicia poco después de la infección. La sincronía puede intensificarse, como se hizo en el experimento mostrado en la figura 8-4, mediante el uso de un virus con una proteína VSVG mutante que no puede salir del retículo endoplásmico de las células infectadas que se cultivan a una temperatura elevada (p. ej., 40°C). Cuando la temperatura se reduce a 32°C, la pro-

Granos de plata
ER rugoso
Gránulo secretor

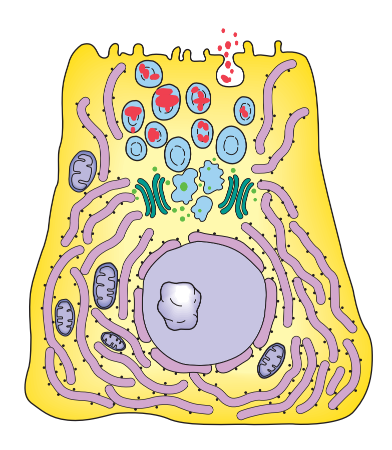
(a)

Luz
Gránulos
Aparato de Golgi
Retículo endoplásmico
Núcleo
Mitocondria
3 min

(b)



(c)



(d)

FIGURA 8-3 Autorradiografía que revela los sitios de síntesis y transporte subsiguiente de las proteínas secretoras. *a)* Micrografía electrónica de un corte de una célula acinar pancreática que se incubó durante tres minutos en aminoácidos radiactivos y luego se fijó y preparó de inmediato para la autorradiografía (véase sección 18.4 para obtener una descripción de la técnica). Los granos negros de plata que aparecen en la emulsión después del desarrollo se localizan en el retículo endoplásmico. *a-d)* Diagramas de una secuencia de autorradiografías que muestran el movimiento de las proteínas secretoras marcadas (representadas por los granos de plata en rojo) a través de la célula acinar pancreática. Cuando la célula se marca con técnica de pulso durante tres minutos y luego se fija de inmediato (como se muestra en *a*), la radiactividad se localiza en el retículo endoplásmico *(b)*. Después de un pulso de 3 min y persecución de 17 min, la marca radiactiva se concentra en el aparato de Golgi y vesículas adyacentes *(c)*. Después de un pulso de 3 min con persecución de 117 min, la radiactividad se concentra en los gránulos secretores y empieza a liberarse a los conductos pancreáticos *(d)*. (*A*, Cortesía de James D. Jamieson y George Palade.)

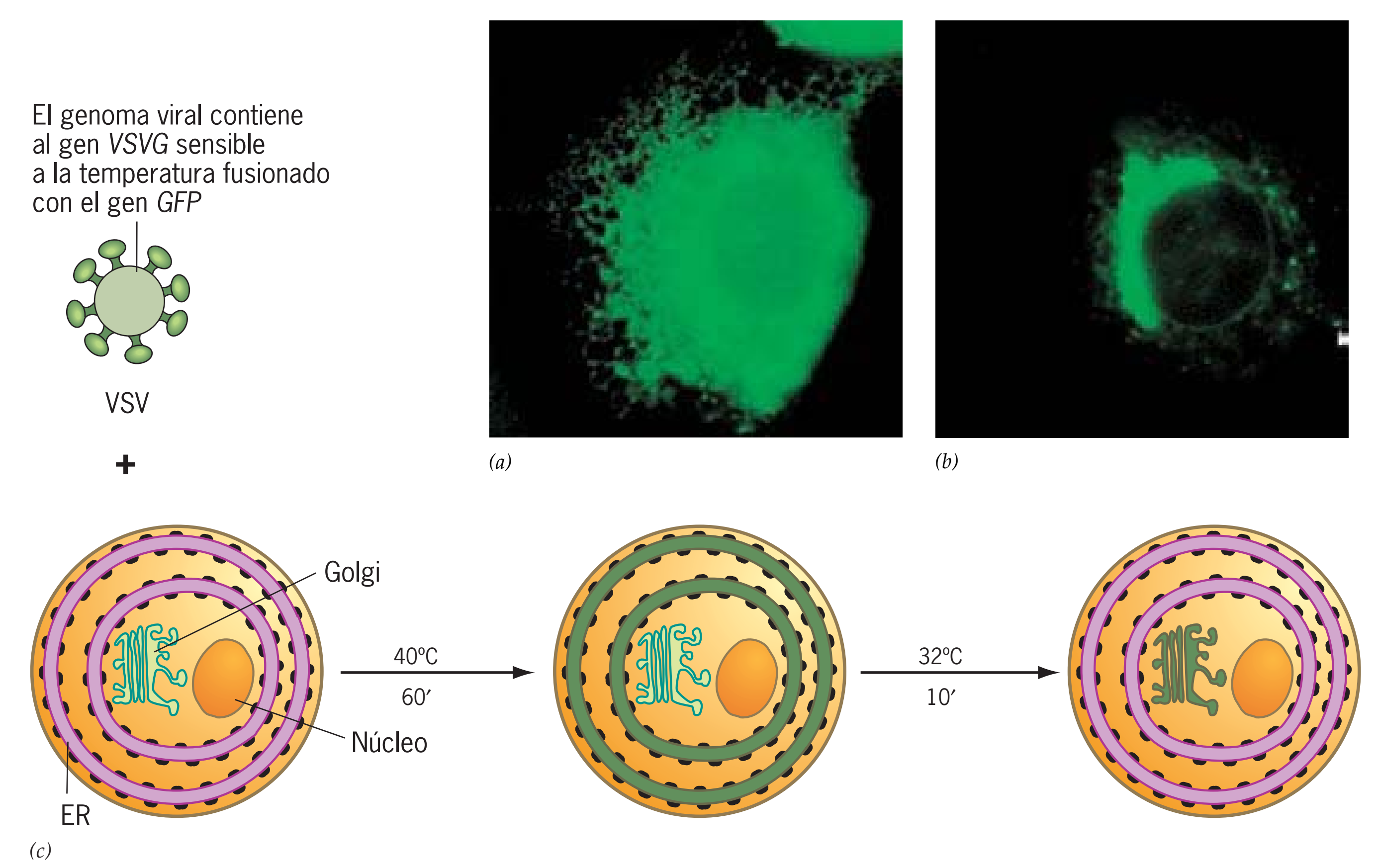


FIGURA 8-4 El uso de proteína verde fluorescente (GFP) revela el movimiento de las proteínas dentro de una célula viva. *a*) Micrografía de fluorescencia de una célula viva de mamífero cultivada que se infectó con el virus VSV a 40°C. Esta tinción particular del virus VSV contenía un gen *VSVG* que: a) se fusionó con un gen para la GFP y *b*) una mutación sensible a la temperatura que impedía que la nueva proteína VSVG sintetizada saliera del ER cuando se mantenía a 40°C. La fluorescencia verde en esta micrografía se limita al ER. *b*) Micrografía de fluorescencia de una célula viva infectada que se mantuvo a 40°C para permitir que la proteína VSVG se acumulara en el ER y luego se incubó a 32°C durante 10 min. La proteína VSVG fluorescente se movió a la región que contiene el aparato de Golgi. *c*) Esquema que muestra la retención de la proteína VSVG mutante en el ER a 40°C y su movimiento sincrónico al aparato de Golgi en los primeros 10 minutos de incubación a una temperatura más baja. (*A* Y *B*, TOMADAS DE DANIEL S. CHAO, ET AL., CORTESÍA DE RICHARD H. SCHELLER. J CELL BIOL 144:873, 1999; CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

teína fluorescente-VSVG que se había acumulado en el retículo endoplásmico (fig. 8-4*a*, *c*) se mueve en forma sincrónica al aparato de Golgi (fig. 8-4*b*, *c*), donde ocurren varios fenómenos del procesamiento, y luego a la membrana plasmática. Los mutantes de este tipo que funcionan de manera normal a una temperatura baja (permisiva), pero no a una temperatura elevada (restrictiva), se describen como *mutantes sensibles a la temperatura*. En la página 323 se muestra un experimento en el que se utilizan dos sondas fluorescentes distintas.

Información obtenida del análisis bioquímico de las fracciones subcelulares

La microscopia electrónica, la autorradiografía y el uso de GFP proporcionan información sobre la estructura y función de los organelos celulares, pero no acerca de la composición molecular de estas estructuras. Albert Claude y Christian De Duve fueron los pioneros en las técnicas para romper (**homogeneizar**) las células y aislar los tipos particulares de organelos en los decenios de 1950 y 1960. Cuando una célula se rompe por homogeneización, las membranas citoplásmicas se fragmentan y los bordes de los fragmentos de la membrana se fusionan para formar vesículas esféricas menores de 100 nm de diámetro. Las vesículas obtenidas de diferentes organelos (núcleo, mitocondria, membrana plasmática, retículo endoplásmico, etc.) tienen diferentes propiedades, que les permiten separarse entre sí. Esta técnica se conoce como **fraccionamiento subcelular**.

Las vesículas membranosas derivadas del sistema endomembranoso (sobre todo del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi) forman colecciones heterogéneas de vesículas de tamaño similar que se conocen como **microsomas**. La figura 8-5*a* muestra una preparación rápida (y esquemática) de la fracción microsómica de una célula. La fracción microsómica puede segmentarse aún más en fracciones de membrana lisa y rugosa (fig. 8-5*b*, *c*) mediante técnicas de gradiente descritas en la sec-

ción 18.6. Una vez aisladas, puede identificarse la composición bioquímica de varias fracciones. Por ejemplo, con esta técnica se encontró que las vesículas derivadas de distintas partes del aparato de Golgi contenían enzimas que agregaban diferentes azúcares al final de una cadena creciente de carbohidrato en una glucoproteína o un glucolípido. Se pudo aislar una enzima específica de la fracción microsómica y luego usarse como antígeno para preparar anticuerpos contra esa enzima. Así, los anticuerpos podían unirse con materiales, como partículas de oro que se podían visualizar con el microscopio electrónico y así reconocer la ubicación de la enzima en el compartimiento de membrana. Estos estudios detallaron el papel del aparato de Golgi en el ensamble secuencial de los carbohidratos complejos.

En los últimos años, la identificación de las proteínas presentes en las fracciones celulares se llevó a un nuevo nivel con la aplicación de la compleja tecnología proteómica. Una vez que se aísla el organelo particular, es posible extraer las proteínas, separarlas e identificarlas mediante espectrometría de masas, como se describe en la página 70. Se pueden reconocer cientos de proteínas al mismo tiempo, lo que proporciona un retrato molecular completo de cualquier organelo que puede prepararse con relativa pureza. En un ejemplo de esta nueva tecnología se encontró que un simple fagosoma (pág. 317) que contiene una cuenta de látex ingerida contenía más de 160 proteínas diferentes, muchas de las cuales nunca se habían identificado o no se sabía que participaran en la fagocitosis.

Información obtenida a partir de sistemas libres de células

Tras desarrollar las técnicas para fraccionar los organelos membranosos, los investigadores empezaron a explorar las capacidades de estas burdas preparaciones subcelulares. Encontraron que las partes aisladas de una célula eran capaces de realizar actividades notables. Dichos **sistemas libres de células**, llamados así porque no contienen células completas, suministraron mucha información sobre los procesos complejos imposibles de estudiar con células intactas. Por ejemplo, durante el decenio de 1960, George Palade, Philip Siekevitz y sus colegas de la *Rockefeller University* se dedicaron a aprender más acerca de las propiedades de la fracción microsómica rugosa (mostrada en la figura 8-5*c*), que se deriva del retículo endoplásmico rugoso (pág. 284). Estos investigadores hallaron que podían liberar una preparación microsómica rugosa de sus partículas adheridas y las partículas aisladas (ribosomas) eran capaces de sintetizar proteínas

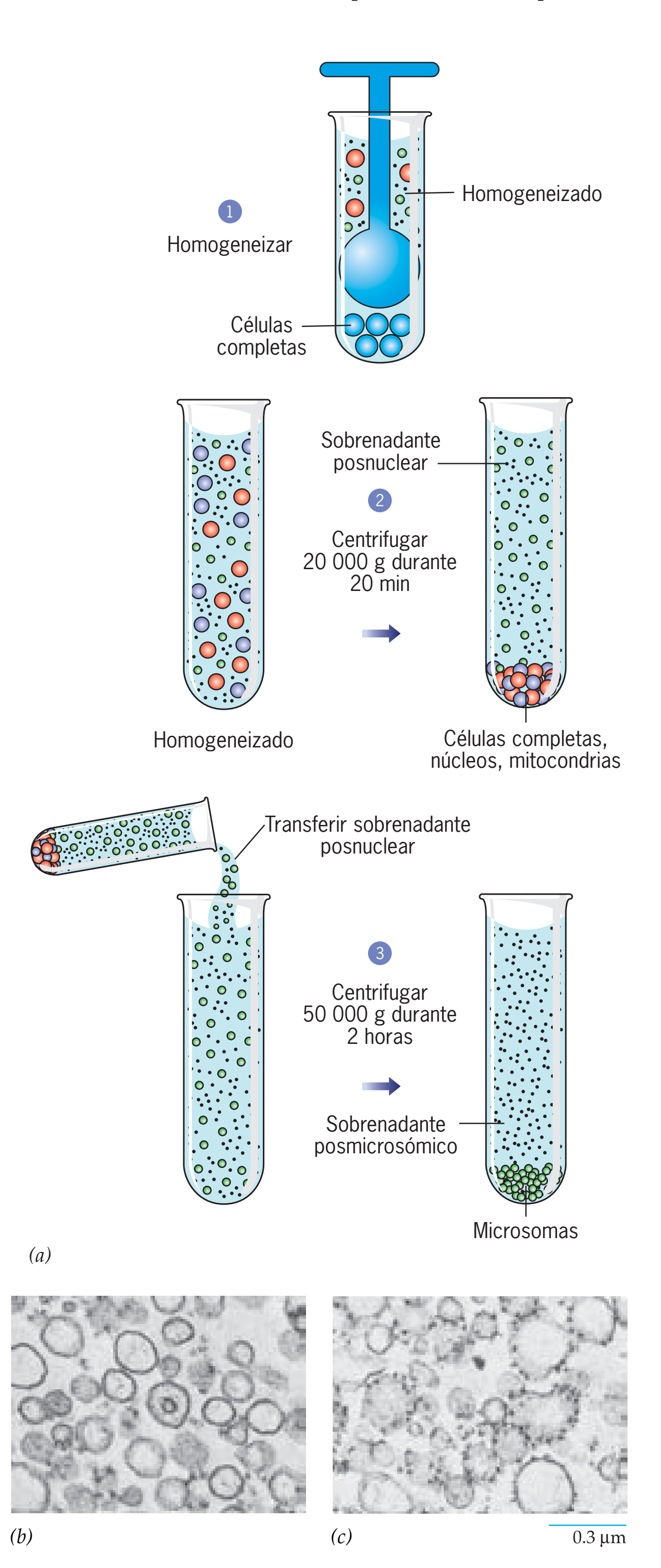


FIGURA 8-5 Aislamiento de una fracción microsómica por centrifugación diferencial. *a)* Cuando una célula se rompe por homogeneización mecánica (paso 1), los diversos organelos membranosos se fragmentan y forman vesículas membranosas esféricas. Las vesículas derivadas de los distintos organelos pueden separarse mediante varias técnicas de centrifugación. En el procedimiento mostrado aquí, el homogeneizado de células se somete primero a centrifugación de baja velocidad para formar pelotillas con las partículas más grandes, como núcleos y mitocondrias, lo que deja las vesículas más pequeñas (microsomas) en el sobrenadante (paso 2). Los microsomas pueden retirarse del sobrenadante por centrifugación a mayor velocidad por periodos más prolongados (paso 3). Una fracción microsómica general de este tipo puede fraccionarse en distintos tipos de vesículas en pasos subsiguientes. *b)* Micrografía electrónica de una fracción microsómica lisa en la que las vesículas membranosas carecen de ribosomas. *c)* Micrografía electrónica de una fracción microsómica rugosa que contiene membranas tachonadas con ribosomas. (*B* Y *C*, CORTESÍA DE J. A. HIGGINS Y R. J. BARNETT.)

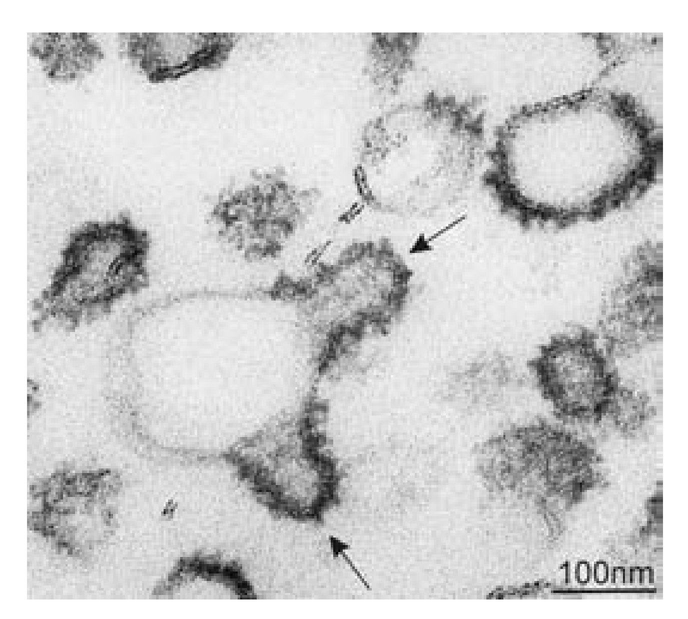


FIGURA 8-6 **Formación de vesículas cubiertas en un sistema libre de células.** Micrografía electrónica de una preparación de lisosomas que se incubó con los componentes necesarios para promover la gemación dentro de la célula. Las proteínas en el medio se unieron con la superficie de los liposomas e indujeron la formación de yemas cubiertas con proteína (flechas). (Cortesía de Lelio Orci y Randy Schekman.)

cuando contaban con los ingredientes necesarios del citosol. En estas condiciones, los ribosomas tan sólo liberaban las proteínas recién sintetizadas al medio acuoso del tubo de ensayo. Cuando se realizó el mismo experimento con microsomas rugosos intactos, las proteínas recién sintetizadas ya no se liberaban al medio de incubación, sino que quedaban atrapadas dentro de la luz de las vesículas membranosas. Con base en estos estudios se concluyó que la membrana microsómica no era necesaria para la incorporación de aminoácidos en las proteínas, pero sí para secuestrar las nuevas proteínas secretoras sintetizadas dentro del espacio de las cisternas del retículo endoplásmico.

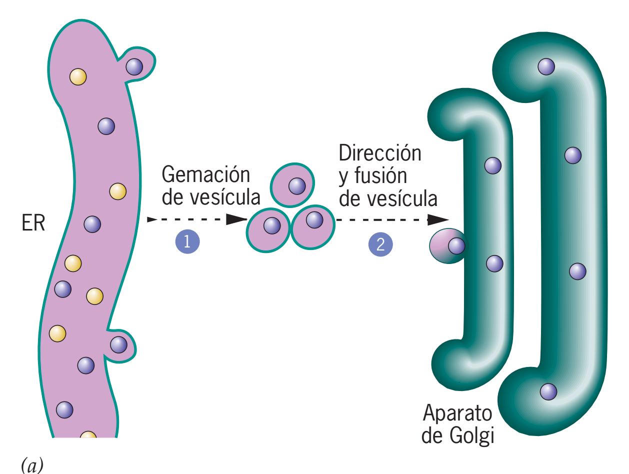
En los últimos decenios, los investigadores emplearon sistemas libres de células para identificar los papeles de muchas de las proteínas participantes en el tránsito de membrana. La figura 8-6 muestra un liposoma con vesículas que se desprenden de su superficie (flechas). Como se explica en la página 128, los liposomas son vesículas cuya superficie consiste en una bicapa artificial que se crea en el laboratorio a partir de fosfolípidos purificados. Las yemas y vesículas que se ven en la figura 8-6 se produjeron después de incubar la preparación de liposomas con proteínas purificadas que en condiciones normales forman cubiertas en la superficie citosólica de las vesículas de transporte dentro de la célula. Sin las proteínas de cubierta adicionales, no ocurriría el desprendimiento de vesículas. Utilizando esta estrategia, en la que los procesos celulares son *reconstituidos* in vitro, los investigadores pudieron estudiar las proteínas que se unen con la membrana para iniciar la formación de vesículas, las proteínas encargadas de la selección del cargamento y las proteínas que cortan la vesícula de la membrana donante.

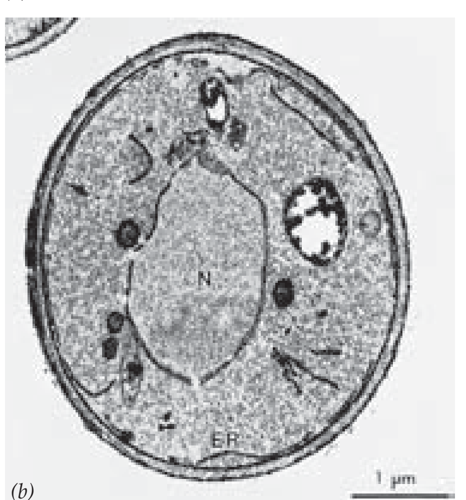
Información obtenida del estudio de mutantes genéticos

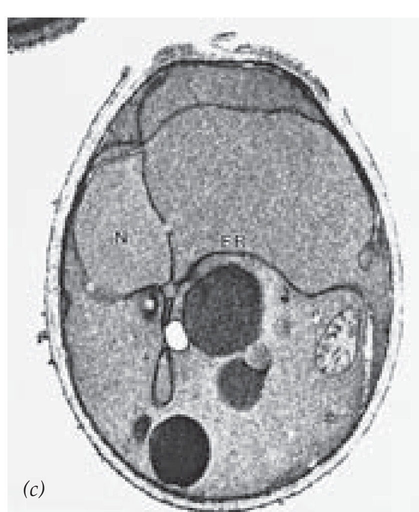
Un mutante es un organismo (o célula cultivada) cuyos cromosomas contienen uno o más genes que codifican proteínas anormales. Cuando una proteína codificada por un gen mutante es incapaz de realizar su función normal, la célula que tiene la mutación presenta una deficiencia característica. La identificación de la naturaleza precisa de la deficiencia proporciona información sobre la función de la proteína normal. El estudio de la base genética de la secreción se ha realizado sobre todo en células de levadura y la mayor parte del trabajo la han realizado Randy Schekman y sus colegas de la *University of California*, en Berkeley. Las levaduras son muy susceptibles a los estudios genéticos porque tienen una pequeña cantidad de genes en comparación con otros tipos de eucariotas; son organismos unicelulares pequeños fáciles de cultivar y pueden crecer como haploides durante la mayor parte de su ciclo celular. Una mutación en un solo gen de una célula haploide tiene un efecto observable porque las células carecen de una segunda copia del gen que enmascararía la presencia de la anormal.

En las levaduras, como en todas las células eucariotas, las vesículas se desprenden del retículo endoplásmico y viajan al aparato de Golgi, donde se fusionan con las cisternas de Golgi (fig. 8-7*a*). Para identificar los genes cuya proteína codificada participa en esta parte de la vía secretora (esto es, genes *SEC*), los investigadores buscan células mutantes que tienen una distribución anormal de membranas citoplásmicas. La figura 8-7*b* muestra una micrografía electrónica de una célula de levadura nativa. La célula que se muestra en la figura 8-7*c* tiene una mutación en el gen que codifica una proteína que participa en la formación de vesículas en la membrana del retículo endoplásmico (paso 1, fig. 8-7*a*). Cuando no forman vesículas, las células mutantes acumulan un retículo endoplásmico extenso. En cambio, la célula mostrada en la figura 8-7*d* posee una mutación en un gen que codifica una proteína participante en la fusión de las vesículas (paso 2, fig. 8-7*a*). Cuando el producto de este gen es defectuoso, las células mutantes acumulan un número excesivo de vesículas no fusionadas. Los investigadores han aislado docenas de mutantes diferentes, que consideradas como grupo presentan interrupciones en todos los pasos de la vía secretora. Ya se clonaron los genes causantes de estos defectos y se identificó su secuencia, además de aislar las proteínas que codifican. El aislamiento de las proteínas de la levadura inició búsquedas exitosas de proteínas homólogas (es decir, proteínas con secuencia relacionada) en sistemas de mamíferos.

Una de las lecciones más importantes que se aprendieron con el uso de todas estas técnicas es que las actividades dinámicas del sistema de endomembrana están muy bien conservadas. No sólo las células de levaduras, plantas, insectos y seres humanos efectúan procesos similares, sino que los llevan a cabo con proteínas muy parecidas. Es evidente que la diversidad estructural de las células contradice sus similitudes moleculares subyacentes. En muchos casos, las proteínas de especies muy distintas son intercambiables. Por ejemplo, los sistemas libres de células obtenidos de células de mamíferos pueden usar proteínas de levaduras para facilitar el transporte de vesículas. Por el contrario, las células de levaduras con deficiencias genéticas que interrumpen alguna fase de la vía biosintética a menudo pueden "curarse" con ingeniería genética para incorporarles genes de mamíferos.







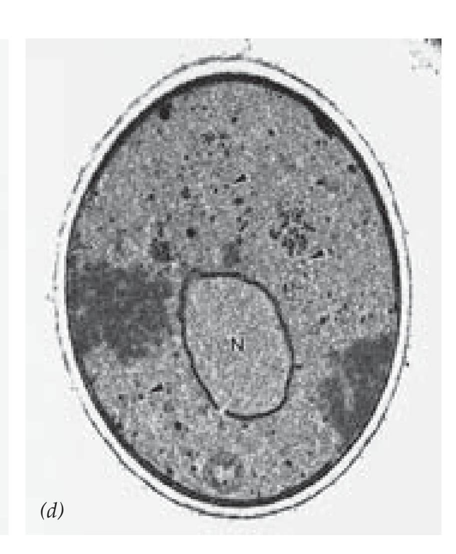


FIGURA 8-7 Uso de mutantes genéticos en el estudio de la secreción. *a)* Primera rama de la vía biosintética secretora en una levadura en gemación. Los pasos se describen más adelante. *b)* Micrografía electrónica de un corte a través de una célula de levadura nativa. *c)* Una célula de levadura que tiene una mutación en el gen *sec12*, cuyo producto participa en la formación de vesículas en la membrana del ER (paso 1, *a*). Debido a que no pueden formarse las vesículas, se acumulan cisternas de ER expandidas en la célula. *d)* Célula de levadura con una mutación en el gen *sec17*, cuyo producto participa en la fusión de las vesículas (paso 2, *a*). Como no pueden fusionarse con las membranas de Golgi, las vesículas (indicadas por puntas de flecha) se acumulan en la célula. (Las mutantes mostradas en *c* y *d* son sensibles a la temperatura [pág. 279]. Cuando se mantienen a una temperatura más baja [permisiva], son capaces de mantener un crecimiento y división normales.) (Tomada de Chris A. Kaiser y Randy Schekman, Cell 61:724, 1990. Con autorización de Cell Press.)

REVISIÓN ?

1. Describa las diferencias entre una autorradiografía de una célula pancreática que se incubó en aminoácidos marcados durante tres minutos y se fijó de inmediato y la de otra célula que se marcó durante tres minutos, se persiguió durante 40 minutos y luego se fijó.
2. ¿Qué técnicas o conductas podría usar para averiguar qué proteínas están presentes de manera normal en el retículo endoplásmico?
3. ¿De qué manera el aislamiento de una levadura mutante que acumula vesículas proporciona información sobre el proceso de tránsito de proteínas?
4. ¿Cómo pueden usarse las GFP para estudiar la dinámica de la membrana?

8.3 EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

El **retículo endoplásmico (ER)** se divide en dos compartimientos, el **retículo endoplásmico rugoso (RER)** y el **retículo endoplásmico liso (SER)** (fig. 8-8). Ambos tipos de retículo forman un sistema de membranas que rodea un espacio, o luz, que está separado del citosol circundante. Como resulta

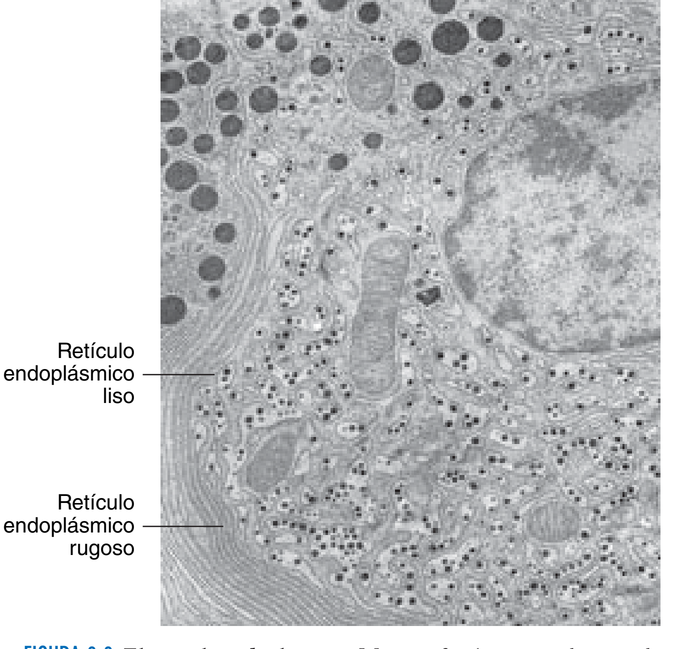


FIGURA 8-8 El retículo endoplásmico. Micrografía electrónica de parte de una célula pancreática de murciélago que muestra los retículos endoplásmicos liso y rugoso. (Keith Porter/Photo Researchers.)

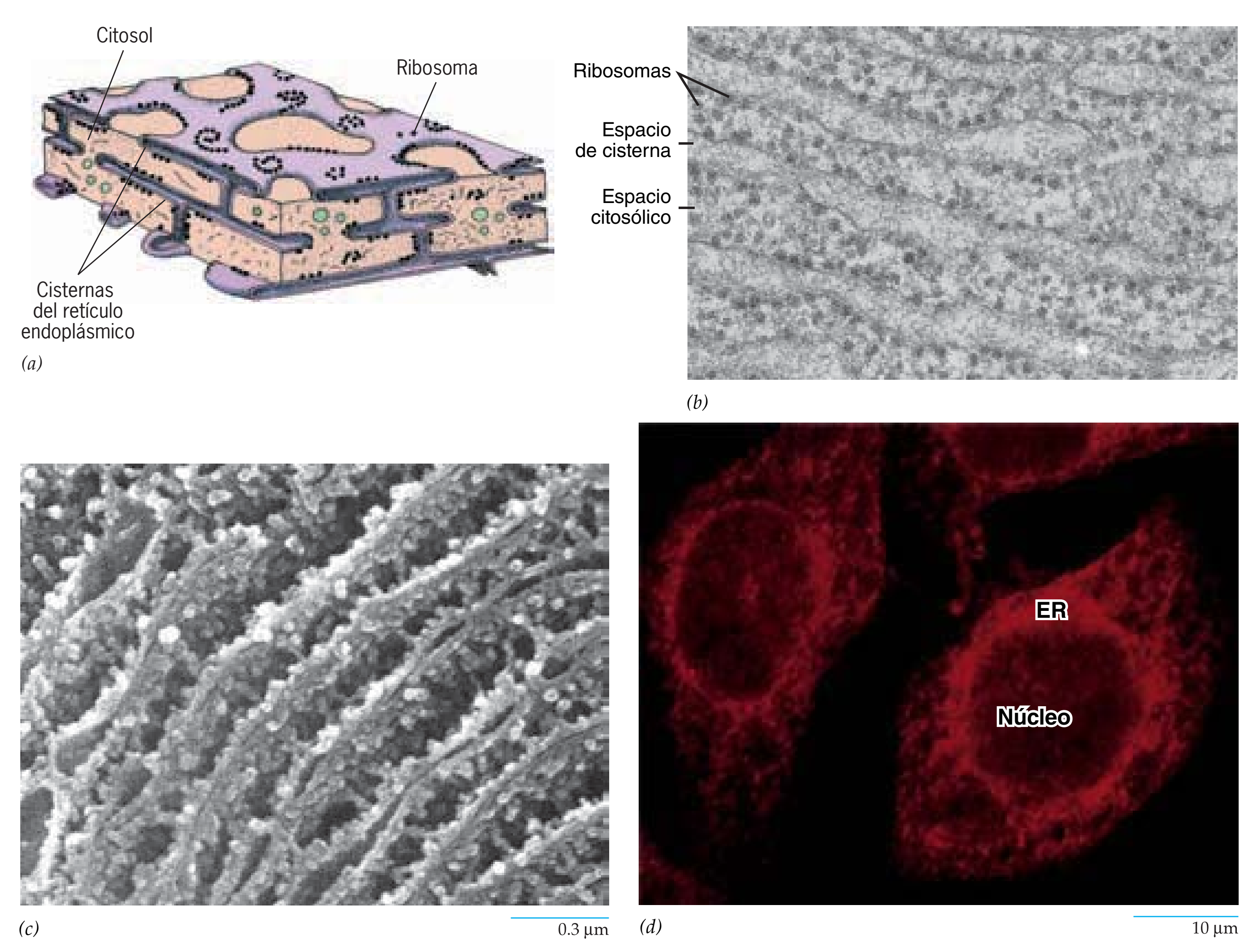


FIGURA 8-9 El retículo endoplásmico rugoso (RER). *a)* Esquema que muestra las pilas de cisternas aplanadas que conforman el ER rugoso. La superficie citosólica de la membrana tiene ribosomas unidos, los cuales dan a las cisternas su apariencia rugosa. *b)* Micrografía electrónica por transmisión de una porción del ER rugoso de una célula acinar pancreática. Es evidente la división del ER rugoso en un espacio de cisterna (libre de ribosomas) y un espacio citosólico. *c)* Micrografía electrónica de barrido del ER rugoso en una célula acinar pancreática. *d)* Visualización del ER rugoso en una célula cultivada completa como se muestra con tinción inmunofluorescente para la proteína isomerasa de disulfuro (PDI), una proteína residente del ER. (*B*, Cortesía de S. Ito; *C*, tomada de K. Tanaka, Int Rev Cytol 68:101, 1980; *D*, tomada de Brian Storrie, Rainer Pepperkok y Tommy Nilsson, Trends Cell Biol 10:338, 2000. © 2000, con autorización de Elsevier Science.)

evidente en la descripción siguiente, la composición del espacio **luminal** o **cisternas** dentro de las membranas del ER es muy diferente de la del **espacio citosólico** circundante.

Las proteínas y lípidos con marcas fluorescentes pueden difundirse de un tipo de retículo endoplásmico al otro, lo que indica que las membranas están interconectadas. De hecho, los dos tipos de compartimientos de dicho retículo comparten muchas de sus proteínas y realizan ciertas actividades comunes, como la síntesis de algunos lípidos y colesterol. Sin embargo, al mismo tiempo muchas proteínas se encuentran sólo en uno u otro tipo de retículo. Como resultado, los dos retículos endoplásmicos tienen diferencias estructurales y funcionales notorias.

El retículo endoplásmico rugoso posee ribosomas unidos a su superficie citosólica, en tanto que el liso carece de los ribosomas. El RER casi siempre se compone de una red de sacos aplanados (**cisternas**), como se muestra en la figura 8-9. El RER se continúa con la membrana externa de la envoltura nuclear, que también tiene ribosomas en su superficie citosólica (fig. 8-2*b*). En cambio, los elementos membranosos del SER casi siempre son tubulares (figs. 8-8 y 8-10) y forman un sistema interconectado de tuberías que se curvan por el citoplasma. Cuando las células se homogeneizan, el SER se fragmenta en vesículas de superficie lisa, en tanto el RER se fragmenta en vesículas de superficie rugosa (fig. 8-5*b*, *c*).

Los diferentes tipos de células contienen proporciones muy distintas de los dos tipos de retículo endoplásmico, según sean las actividades de la célula. Por ejemplo, las células que secretan grandes cantidades de proteínas, como las pancreáticas o las células de las glándulas salivales, tienen regiones extensas de RER (fig. 8-9*b*, *c*). Más adelante se regresa a la función del RER, pero primero se describen las actividades del retículo endoplásmico liso.

El retículo endoplásmico liso

El SER está muy desarrollado en diversos tipos celulares, entre ellos los del músculo esquelético, túbulos renales y glándulas endocrinas productoras de esteroides (fig. 8-10). Las funciones del SER incluyen:

- Síntesis de hormonas esteroideas en las células endocrinas de las gónadas y la corteza suprarrenal.
- Desintoxicación en el hígado de diversos compuestos orgánicos, como barbitúricos y etanol, cuyo consumo crónico puede conducir a la proliferación del SER en las células hepáticas. La desintoxicación la realiza un sistema de enzimas que transfieren oxígeno (oxigenasas), incluida la familia del *citocromo P-450*. Estas enzimas son notables por su falta de especificidad de sustrato y pueden oxidar miles de compuestos hidrófobos distintos y convertirlos en sustancias más hidrofílicas y más fáciles de excretar. Los efectos no siempre son positivos. Por ejemplo, el compuesto relativamente inocuo benzo[*a*]pireno que se forma cuando se requema la carne en una parrilla se convierte en un carcinógeno potente por efecto de las enzimas "desintoxicantes" del SER. Las enzimas del citocromo P-450 metabolizan muchos medicamentos prescritos y la variación genética en estas enzimas en los seres humanos explica las diferencias en la efectividad y acciones colaterales de muchos fármacos entre unas personas y otras.
- Secuestro de iones calcio dentro del citoplasma de las células de los músculos esquelético y cardiaco. La liberación regulada de Ca^{2+} del SER (o retículo sarcoplásmico en el caso de las células musculares) inicia la contracción.

Funciones del retículo endoplásmico rugoso

Las investigaciones iniciales sobre las funciones del RER se realizaron en células que secretan grandes cantidades de proteína, como las células acinares del páncreas (fig. 8-3) o las células secretoras de moco del recubrimiento del tubo digestivo (fig. 8-11). A partir del dibujo y la micrografía de la figura 8-11 resulta evidente que los organelos de estas células epiteliales secretoras se disponen de tal forma en la célula que producen una polaridad distinta en uno y otro extremos de ella. El núcleo y un conjunto grande de cisternas de RER se localizan cerca de la superficie basal de la célula, la cual está próxima al aporte sanguíneo. El aparato de Golgi se localiza en la región central de la célula. La superficie apical de la célula está junto a un conducto que transporta las proteínas secretadas fuera del órgano. El citoplasma del extremo apical de la célula está lleno de gránulos secretores cuyo contenido está listo para liberarse hacia el conducto en cuanto llega la señal apropiada. La polaridad de estas células epiteliales glandulares refleja el movimiento de las proteínas secretoras por la célula, desde el sitio de síntesis hasta el punto por donde se descargan. El retículo endoplásmico rugoso es el punto inicial de la vía biosintética: es el punto donde se sintetizan las proteínas, cadenas de carbohidratos y fosfolípidos que viajan por los compartimientos membranosos de la célula.

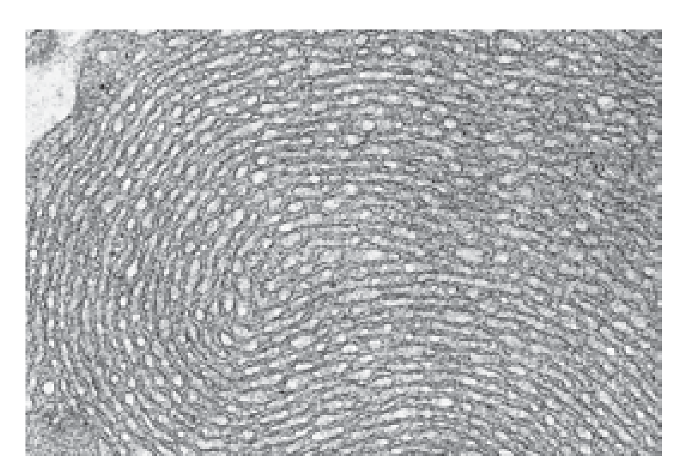


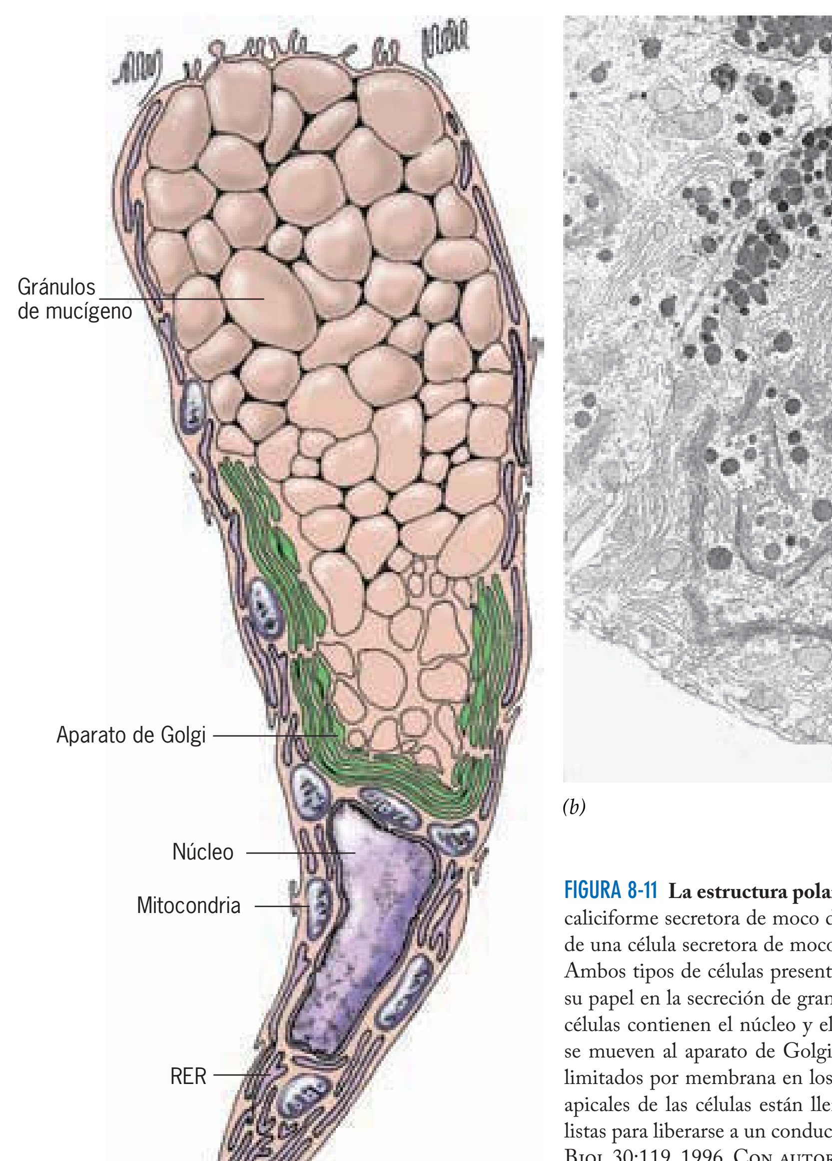
FIGURA 8-10 El retículo endoplásmico liso (SER). Micrografía electrónica de una célula de Leydig del testículo que muestra el ER liso extenso en el que se sintetizan las hormonas esteroideas. (Tomada de Don Fawcett/Visuals Unlimited.)

Síntesis de proteínas en ribosomas unidos a la membrana o en ribosomas libres Ya fue descrito (fig. 8-3) el descubrimiento del retículo endoplásmico rugoso como sitio de la síntesis de proteínas secretoras en las células acinares pancreáticas. Se obtuvieron resultados similares para otros tipos de células secretoras, incluidas las células caliciformes del intestino que secretan mucoproteínas, las células endocrinas que producen hormonas polipeptídicas, las células plasmáticas que secretan anticuerpos y las células hepáticas que secretan proteínas séricas a la sangre.

Experimentos posteriores han revelado que los polipéptidos se sintetizan en dos puntos distintos dentro de la célula.

1. Ciertos polipéptidos se sintetizan en los ribosomas unidos con la superficie citosólica de las membranas del RER. Éstos incluyen: a) las proteínas que secreta la célula, b) proteínas integrales de la membrana y c) proteínas solubles que se encuentran en compartimientos del sistema de endomembrana, como el retículo endoplásmico, aparato de Golgi, lisosomas, endosomas, vesículas y vacuolas vegetales.
2. Otros polipéptidos se sintetizan en ribosomas "libres", es decir, los que no están unidos al RER, y luego se liberan al citosol. Esta clase incluye a: a) las proteínas destinadas a permanecer en el citosol (como las enzimas de la glucólisis y las proteínas del citoesqueleto), b) proteínas periféricas de la superficie interna de la membrana plasmática (como espectrinas y anquirinas que sólo mantienen una relación débil con la superficie citosólica de la membrana), c) proteínas transportadas al núcleo (sección 12.1) y d) proteínas que se incorporan en los peroxisomas, cloroplastos y mitocondrias. Las proteínas de los dos últimos grupos se sintetizan hasta terminarlas en el citosol y luego se importan *después de la traducción* al organelo apropiado a través de su membrana limitante (pág. 318).

¿Qué determina el sitio de la célula en el que se sintetiza una proteína? A principio del decenio de 1970, Günter Blobel, en colaboración con David Sabatini y Bernhard Dobberstein



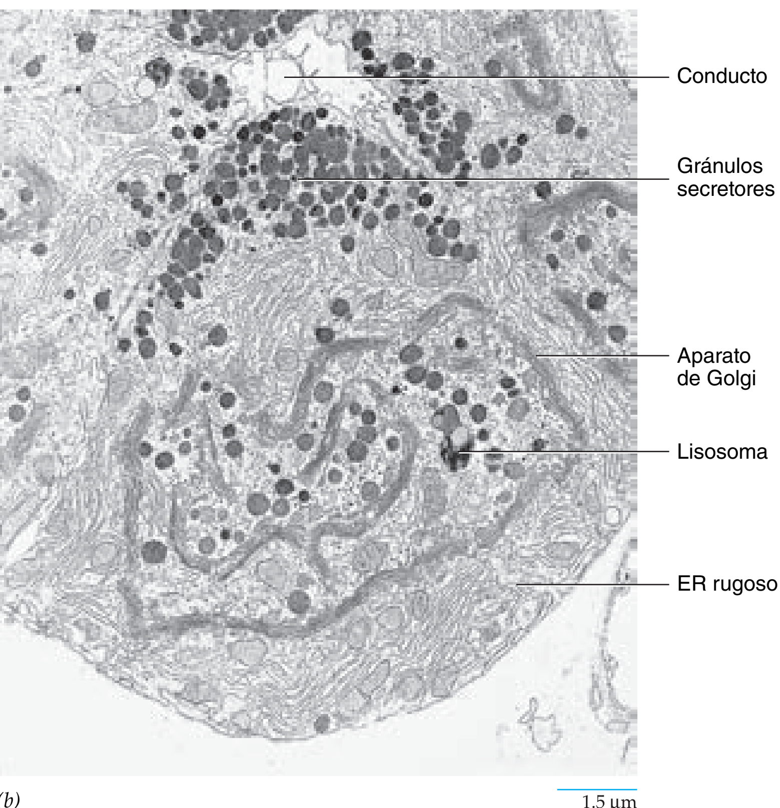


FIGURA 8-11 La estructura polarizada de la célula secretora. *a)* Representación de una célula caliciforme secretora de moco del colon de una rata. *b)* Micrografía electrónica de bajo poder de una célula secretora de moco de la glándula de Brunner del intestino delgado de un ratón. Ambos tipos de células presentan una disposición muy polarizada de los organelos y reflejan su papel en la secreción de grandes cantidades de mucoproteínas. Los extremos basales de las células contienen el núcleo y el ER rugoso. Las proteínas que se sintetizan en el ER rugoso se mueven al aparato de Golgi relacionado que está muy cerca y de ahí pasan a portadores limitados por membrana en los que se concentra el producto de secreción final. Las regiones apicales de las células están llenas con gránulos secretores que contienen las mucoproteínas listas para liberarse a un conducto. (*A*, TOMADA DE MARIAN NEUTRA Y C. P. LEBLOND, J CELL BIOL 30:119, 1996. CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS. *B*, TOMADA DE ALAIN RAMBOURG E YVES CLERMONT, EUR J CELL BIOL 51:196, 1990.)

de la *Rockefeller University*, propusieron por primera vez, y luego demostraron, que el sitio de la síntesis de una proteína dependía de la secuencia de aminoácidos en la porción N-terminal del polipéptido, que es la primera parte que surge del ribosoma durante la síntesis de las proteínas. Estos investigadores sugirieron lo siguiente:

1. Las proteínas secretoras contienen una **secuencia de señal** en su extremo N que dirige al polipéptido emergente y al ribosoma hacia la membrana del retículo endoplásmico.
2. El polipéptido se mueve en dirección al espacio de cisterna del retículo endoplásmico a través de un canal acuoso recubierto con proteína en la membrana del retículo endoplásmico. Se ha propuesto que el polipéptido se mueve por la membrana conforme se sintetiza, esto es, *al mismo tiempo de la traducción.*[2]

Esta proposición, conocida como la *hipótesis de la señal*, tiene el respaldo de abundante evidencia experimental. Algo aún más importante: se demostró que el concepto original de Blobel,

[2] Hay que señalar que el transporte de proteínas a través de la membrana del ER también puede ocurrir después de la traducción (es decir, luego de la síntesis). En este proceso, el polipéptido se sintetiza por completo en el citosol y luego se importa a la luz del ER a través de los mismos canales conductores de proteínas usados en la vía que funciona al mismo tiempo que la traducción. La vía posterior a la traducción se utiliza mucho más en levaduras que en células de mamíferos para importar productos al ER. En realidad, las células de levaduras son incapaces de realizar el transporte al ER al mismo tiempo que la traducción y aun así sobreviven, aunque crecen con más lentitud que las células normales.

según el cual las proteínas tienen incluidos "códigos postales", se aplica en principio a todos los tipos de proteína que transitan las vías de la célula. Blobel recibió el premio Nobel de Medicina en 1999 por estos estudios pioneros.

Síntesis de proteínas secretoras, lisosómicas o vacuolares vegetales en los ribosomas unidos a membranas Los pasos durante la síntesis de una proteína secretora, lisosómica o vacuolar vegetal se muestran en la figura 8-12. La síntesis del polipéptido inicia después que un RNA (ácido ribonucleico) mensajero se une con un ribosoma libre, es decir, uno que *no* esté unido con una membrana citoplásmica. De hecho, se cree que todos los ribosomas son idénticos; los empleados en la síntesis de proteínas secretoras, lisosómicas o las de las vacuolas vegetales se toman de la misma población (*reserva*) que los utilizados en la producción de proteínas que permanecen en el citosol. Los polipéptidos sintetizados en ribosomas unidos con membranas contienen una secuencia de señal, que incluye un segmento de seis a 15 residuos de aminoácidos hidrófobos, y que dirige al polipéptido *naciente* a la membrana del retículo endoplásmico, y además conduce a la división en compartimientos del polipéptido dentro de la luz de este retículo. (Un polipéptido *naciente* es uno que esté en proceso de síntesis.) Aunque la secuencia de señal casi siempre se localiza en o cerca del extremo N, en algunos polipéptidos ocupa una posición interna.

Conforme surge del ribosoma, **una partícula de reconocimiento de señal (SRP)** identifica la secuencia de señal hidrófoba; dicha partícula posee en las células de mamíferos seis polipéptidos distintos y una pequeña molécula de RNA, llamada RNA 7S. La SRP se une tanto a la secuencia señal en el polipéptido naciente como al ribosoma (paso 1, fig. 8-12), con lo que detiene temporalmente la síntesis de más polipéptido. La SRP sirve como una marca que permite que el complejo entero (SRP-ribosoma-polipéptido naciente) se una específicamente a la superficie citosólica de la membrana del retículo endoplásmico. La unión a este último ocurre a través de cuando menos dos interacciones bien definidas: una entre la SRP y el **receptor de SRP** (paso 2), y la otra entre el ribosoma y el **translocón** (paso 3). El translocón es un canal recubierto de proteína embebido en la membrana del retículo endoplásmico, a través del cual el polipéptido naciente puede moverse en su paso del citosol a la luz del retículo endoplásmico.

En los últimos años, uno de los mayores desafíos en el campo del tráfico de membrana ha sido la determinación de la estructura tridimensional de una versión procariótica del translocón mediante cristalografía de rayos X. Este esfuerzo reveló la presencia dentro del translocón de un poro con forma de reloj de arena, con un anillo de seis aminoácidos hidrófobos en su diámetro más estrecho. En el estado inactivo (es decir, sin transposición), que fue el estado en el que se cristalizó la estructura, la abertura del anillo del poro está taponada por una hélice α corta. Se propone que este tapón sella el canal, impidiendo el paso indeseado de calcio y otros iones entre el citosol y la luz del retículo endoplásmico.

Una vez que el complejo SRP-ribosoma-cadena naciente se une a la membrana del retículo endoplásmico (paso 2, fig. 8-12), la SRP se libera de su receptor en el ER, el ribosoma se une al extremo citosólico del translocón, y la secuencia señal en el polipéptido naciente se inserta en el estrecho canal acuoso del translocón (paso 3). Se propone que el contacto de la secuencia señal con el interior del translocón causa el desplazamiento del tapón y la abertura del pasaje. El polipéptido en crecimiento se transpone entonces a través del anillo del poro hidrófobo hacia la luz del retículo endoplásmico (paso 4). Dado que el anillo

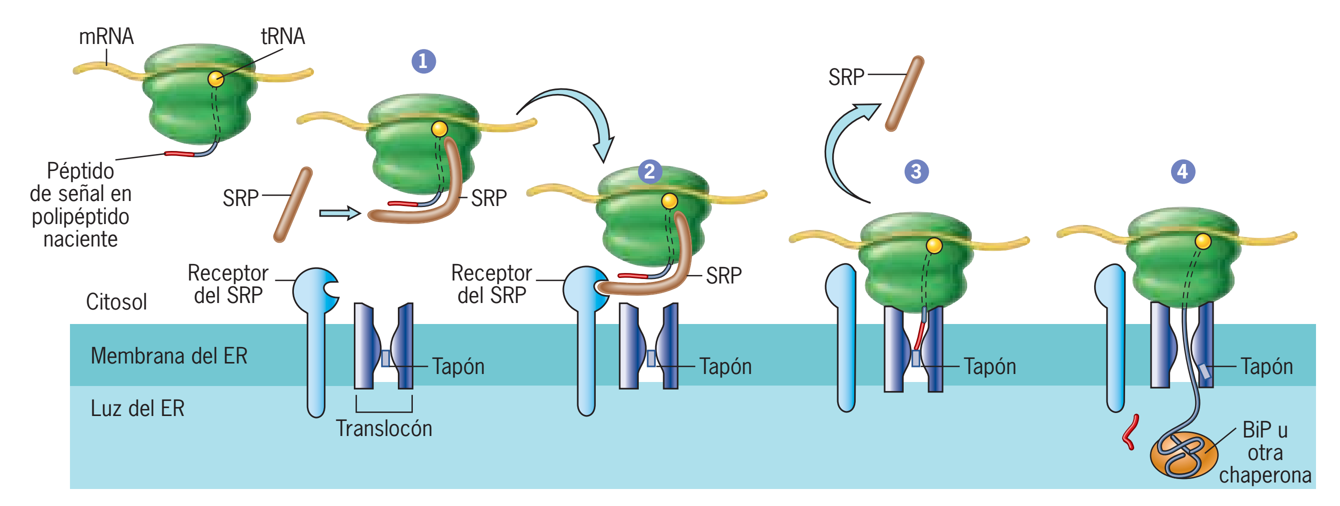


FIGURA 8-12 Modelo esquemático para la síntesis de una proteína secretora (o una enzima lisosómica) en un ribosoma unido con la membrana del ER rugoso. La síntesis del polipéptido comienza en un ribosoma libre. Conforme la secuencia señal (mostrada en rojo) emerge del ribosoma, se une a la SRP (paso 1), lo cual detiene la traducción hasta que el complejo SRP-ribosoma-cadena naciente puede hacer contacto con la membrana del retículo endoplásmico. El complejo SRP-ribosoma choca entonces con un receptor de SRP situado dentro de la membrana del retículo endoplásmico y se une con él (paso 2). La unión de este complejo al receptor de SRP es seguida por la liberación de la SRP y el enlace del ribosoma con un translocón de la membrana del retículo endoplásmico (paso 3). Estos últimos procesos son acompañados por la hidrólisis recíproca de moléculas de GTP (no se muestra) unidas tanto a la SRP como a su receptor. En el modelo descrito aquí, el péptido señal se une entonces al interior del translocón, desplazando el tapón del canal y permitiendo que el resto del polipéptido se trasponga a través de la membrana de manera cotraduccional (paso 4). Después de que el polipéptido naciente pasa a la luz del ER, el péptido señal se escinde por acción de una proteína de membrana (la peptidasa señal, que no se muestra), y la proteína se pliega con la ayuda de carabinas del retículo endoplásmico, como BiP.

del poro observado en la estructura cristalina tiene un diámetro (5 a 8 Å) considerablemente menor que el de una cadena polipeptídica helicoidal, se supone que el poro se expande cuando la cadena naciente atraviesa el canal. (La expansión es posible porque los residuos que constituyen el anillo están situados en diferentes hélices de la proteína del translocón.) Cuando terminan la traducción y el paso del polipéptido completo por el translocón, el ribosoma unido a membrana se libera de la membrana del retículo endoplásmico y el tapón helicoidal se reinserta en el canal del translocón.

Varios de los pasos incluidos en la síntesis y tránsito de las proteínas secretoras se regulan mediante la unión o hidrólisis de GTP (trifosfato de guanosina). Como se trata con detalle en el capítulo 15 y en otra parte de este capítulo, las proteínas de **unión con GTP** (o **proteínas G**) tienen papeles reguladores clave en muchos procesos celulares diferentes.[3] Las proteínas G pueden estar presentes en por lo menos dos conformaciones alternativas, una que contiene una molécula de GTP unida y la otra con una molécula GDP. Las versiones unidas con GTP y GDP de una proteína G tienen conformaciones diferentes y, por consiguiente, capacidades distintas para unirse con otras proteínas. A causa de esta diferencia en las propiedades de unión, las proteínas G actúan como "interruptores moleculares", la proteína unida con GTP casi siempre activa el proceso y la hidrólisis del GTP unido lo apaga. Entre los componentes mostrados en la figura 8-12, la SRP y el receptor para SRP son proteínas G. La hidrólisis del GTP unido con estas dos proteínas ocurre entre los pasos 2 y 3 e inicia la liberación de la secuencia de señal por la SRP y su inserción en el translocón.

Procesamiento de proteínas recién sintetizadas en el retículo endoplásmico Cuando un polipéptido naciente entra a la cisterna del RER, se somete a la acción de varias enzimas localizadas dentro de la membrana o en la luz del RER. La porción N-terminal que contiene el péptido de señal se retira de la mayoría de los polipéptidos nacientes por acción de una enzima proteolítica, la **peptidasa de señal**. Los carbohidratos se agregan a la proteína naciente mediante la enzima *oligosacariltransferasa* (descrita en la página 291). La peptidasa de señal y la oligosacariltransferasa son proteínas integrales de la membrana que están próximas al translocón y actúan sobre las proteínas nacientes conforme entran a la luz del retículo endoplásmico.

El RER es una importante planta procesadora de proteínas. Para realizar sus funciones, la luz del RER está empacada con carabinas moleculares que reconocen proteínas desplegadas o mal plegadas, se unen a ellas y les dan la oportunidad de adquirir su estructura tridimensional correcta (nativa) (pág. 291). La luz del retículo endoplásmico también contiene varias enzimas procesadoras de proteínas, como la *isomerasa de disulfuro de proteína* (PDI, del inglés *protein disulfide isomerase*). Las proteínas entran en la luz del retículo endoplásmico con sus residuos cisteína en el estado reducido (—SH), pero salen del compartimiento con muchos de estos residuos unidos entre sí como disulfuros oxidados (—SS—) (pág. 53). La formación (y el reordenamiento) de los enlaces disulfuro es catalizada por PDI. Los enlaces disulfuro tienen una función esencial en el mantenimiento de la estabilidad de las proteínas que se encuentran en la superficie extracelular de la membrana plasmática o que se secretan al espacio extracelular.

El retículo endoplásmico tiene la construcción ideal para cumplir su papel como puerto de entrada a la vía biosintética de la célula. Su membrana suministra una gran superficie en la cual pueden unirse muchos ribosomas (se estima que son 13 millones en cada célula hepática). La luz de las cisternas del retículo endoplásmico proporciona un ambiente local que favorece el plegamiento y ensamble de las proteínas, así como un compartimiento en el que las proteínas secretoras, lisosómicas y vacuolares de las células vegetales pueden separarse de otras proteínas recién sintetizadas. La separación de las proteínas nuevas en las cisternas del ER las retira del citosol y permite modificarlas y enviarlas a su destino final, ya sea fuera de la célula o dentro de alguno de los organelos membranosos del citoplasma.

Síntesis de proteínas integrales de membrana en los ribosomas unidos a la membrana Las proteínas integrales de la membrana, distintas a las de las mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas, también se sintetizan en los ribosomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico. Estas proteínas de membrana se trasladan a la membrana del ER conforme se sintetizan (esto es, al mismo tiempo que la traducción) con los mismos mecanismos descritos para la síntesis de las proteínas secretoras y lisosómicas (fig. 8-12). Sin embargo, a diferencia de las proteínas secretoras solubles y las lisosómicas, que pasan por completo a través de la membrana del retículo endoplásmico durante la transposición, las proteínas integrales de membrana contienen uno o más segmentos transmembranosos hidrófobos (pág. 130) que son desviados directamente del canal del translocón hacia el interior de la bicapa lipídica. ¿Cómo puede ocurrir tal transferencia? Los estudios de cristalografía de rayos X del translocón antes descritos mostraron que este último tiene una conformación en forma de almeja con un surco o costura a lo largo del costado de la pared, donde el canal podría abrirse y cerrarse. Se propone que cuando un polipéptido pasa por el translocón, este "puente" lateral en el canal se abre y cierra continuamente, lo cual da a cada segmento del polipéptido naciente la oportunidad de dividirse conforme a sus propiedades de solubilidad en el compartimiento acuoso del interior del canal del translocón o el centro hidrófobo circundante de la bicapa lipídica. Aquellos segmentos del polipéptido naciente que sean lo suficientemente hidrófobos se "disolverán" de manera espontánea en la bicapa lipídica y a fin de cuentas se convertirán en segmentos transmembranosos de una proteína integral de membrana. Este concepto ha recibido fuerte apoyo de un estudio in vitro en el cual se dio a los translocones la oportunidad de transponer proteínas nacientes "personalizadas" que contenían segmentos de prueba de diversas hidrofobicidades. Cuanto más hidrófobo el segmento de prueba, tanto mayor la probabilidad de que pasara por la pared del translocón y se integrara como un segmento transmembranoso de la bicapa.

La figura 8-13 muestra la síntesis de un par de proteínas integrales de membrana que contienen un solo segmento transmembranoso. Las proteínas que cruzan una sola vez la membrana pueden estar orientadas con el extremo N hacia el citosol o hacia la luz del retículo endoplásmico (y en última instancia

[3] Las proteínas GTP casi siempre requieren proteínas accesorias para realizar su función. Los papeles de estas proteínas se describen en el capítulo 15 y se ilustran en la figura 15-19. No se consideran en este capítulo, aunque participan en estas actividades.

hacia el espacio extracelular). Como se indica en la página 134, el factor determinante más frecuente de la alineación de la proteína de membrana es la presencia de residuos de aminoácidos con carga positiva que flanquean el extremo citosólico de un segmento transmembranoso (véase fig. 4-17). Durante la síntesis de las proteínas de membrana, se cree que el recubrimiento interno del translocón orienta al polipéptido naciente, como se indica en la figura 8-13, de manera que el extremo más positivo se dirija hacia el citosol. En las proteínas que cruzan varias veces la membrana (como se muestra en la figura 4-31*d*), los segmentos transmembranosos secuenciales tienen orientaciones opuestas. Para estas proteínas, uno de cada dos segmentos transmembranosos debe girarse 180° antes de salir del translocón. Los estudios sugieren que un translocón es capaz, por sí mismo, de orientar en forma apropiada los segmentos transmembranosos. Pareciera que el translocón es más que un simple paso por la membrana del retículo endoplásmico; es una "máquina" compleja capaz de reconocer varias secuencias de señal y realizar actividades mecánicas complejas.

Biosíntesis de membrana en el retículo endoplásmico

Las membranas no surgen *de novo*, es decir, por la combinación de elementos de las reservas de proteínas y lípidos. Por el contrario, se asume que las membranas surgen sólo de las membranas preexistentes. Las membranas crecen conforme las proteínas y lípidos recién sintetizados se insertan en las membranas existentes en el ER. Como resulta evidente en la discusión siguiente, los componentes de la membrana pasan del retículo endoplásmico a todos los demás compartimientos de la célula. Cuando la membrana se mueve de un compartimiento al siguiente, sus proteínas y lípidos se modifican por efecto de las enzimas que residen en los diversos organelos de la célula. Estas modificaciones contribuyen a dar a cada compartimiento de membrana una composición única y una identidad distintiva.

Hay que recordar que las membranas celulares son asimétricas: las dos capas de fosfolípidos (hojas) de una membrana tienen diferentes composiciones (pág. 138). Esta asimetría se establece al principio en el retículo endoplásmico, y se mantiene cuando la membrana se desprende de un compartimiento y se fusiona con el siguiente. Como resultado, los componentes situados en la superficie citosólica de la membrana del retículo endoplásmico pueden identificarse en la superficie citosólica de las vesículas de transporte, en la superficie citosólica de las cisternas de Golgi y en la superficie interna (citoplásmica) de la membrana plasmática (fig. 8-14). De igual manera, los componentes situados en la superficie luminal de la membrana del retículo endoplásmico mantienen su orientación y se encuentran en la superficie externa de la membrana plasmática. De hecho, de muchas maneras, incluida su alta concentración de calcio, potencial de oxidación y contenido de carbohidratos, la luz del ER se parece mucho al espacio extracelular.

Síntesis de los lípidos de la membrana La mayoría de los lípidos de la membrana se sintetiza por completo dentro del retículo endoplásmico. Las principales excepciones son: a) la esfingomielina y los glucolípidos, cuya síntesis comienza en el ER y se completa en el aparato de Golgi, y b) algunos de los lípidos únicos de las membranas de mitocondrias y cloroplastos, que se sintetizan por acción de enzimas que residen en esas membranas. Las enzimas participantes en la síntesis de fosfolípidos son proteínas integrales de la membrana del retículo endoplásmico y sus sitios activos están dirigidos hacia el citosol. Los fosfolípidos recién producidos se insertan en la mitad de la bicapa dirigidos hacia el citosol. Algunas de estas moléculas de lípidos se giran más tarde hacia la hoja contraria mediante la acción de enzimas llamadas *flipasas.* Los lípidos son transportados del retículo endoplásmico al aparato de Golgi y la membrana plasmática como parte de la bicapa que constituye las paredes de las vesículas de transporte.

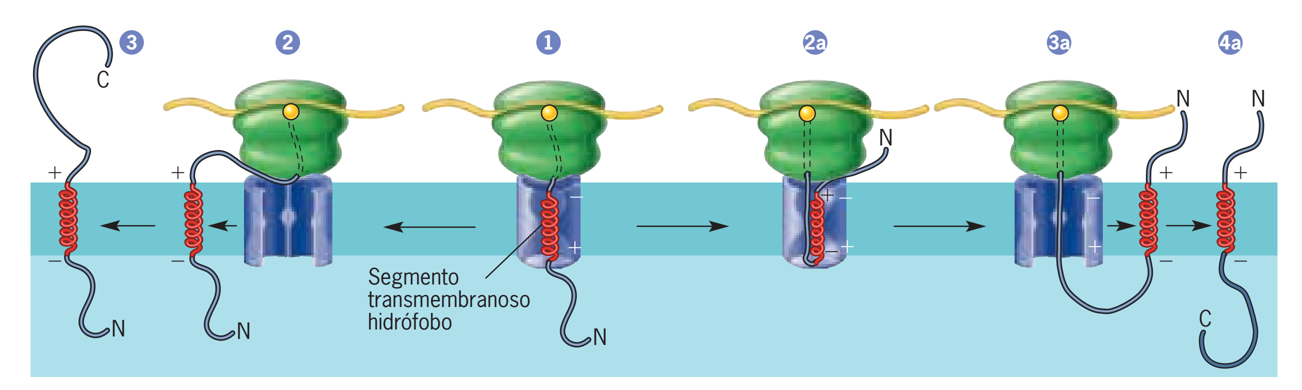


FIGURA 8-13 Modelo esquemático para la síntesis de una proteína integral de membrana que contiene un solo segmento transmembranoso y una secuencia de señal cerca del extremo N del polipéptido naciente. La SRP y los diversos componentes de la membrana que se mostraron en la figura 8-12 también participan en la síntesis de proteínas integrales, pero se omitieron para que la imagen fuera más sencilla. El polipéptido naciente entra al translocón justo como si fuera una proteína secretora (paso 1). Sin embargo, la entrada de la secuencia hidrófoba de paro-transferencia al poro bloquea la translocación adicional del polipéptido naciente por el canal. Los pasos 2 y 3 muestran la síntesis de una proteína transmembranosa cuyo extremo N está en la luz del retículo endoplásmico y cuyo extremo C está en el citosol. En el paso 2, el translocón se ha abierto lateralmente y ha expelido el segmento transmembranoso dentro de la bicapa. El paso 3 muestra el depósito final de la proteína. Los pasos 2a a 4a muestran la síntesis de una proteína transmembranosa cuyo extremo C está en la luz y cuyo extremo N está en el citosol. En el paso 2a, el translocón ha reorientado el segmento transmembranoso, en virtud de sus flancos con carga positiva y negativa invertidos. En el paso 3a, el translocón se ha abierto lateralmente y ha expelido el segmento transmembranoso dentro de la bicapa. El paso 4 muestra el depósito final de la proteína. Los signos + y – en color blanco indican la carga exhibida por el recubrimiento interno del translocón.

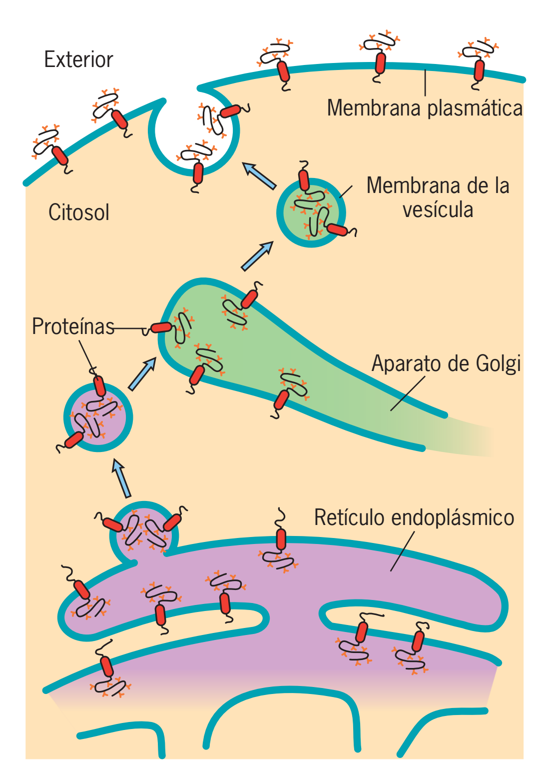
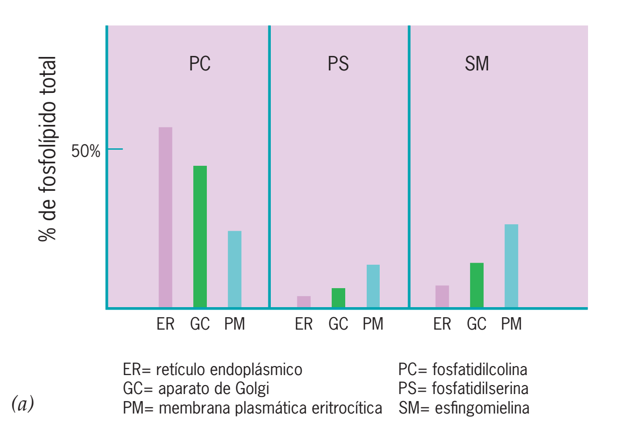


FIGURA 8-14 Mantenimiento de la asimetría de la membrana. Cuando cada proteína se sintetiza en el ER rugoso, se inserta en la bicapa de lípidos con una orientación predecible determinada por su secuencia de aminoácidos. Esta orientación se mantiene mientras viaja en el sistema endomembranoso, como se ilustra en la figura. Las cadenas de carbohidrato, que son las primeras agregadas en el ER, representan una manera conveniente de valorar la lateralidad de la membrana porque siempre están en el lado de la cisterna de las membranas citoplásmicas, que se convierte en el lado exoplásmico de la membrana plasmática después de la fusión de las vesículas con ésta.

Las membranas de los diferentes organelos tienen una composición de lípidos muy diferente (fig. 8-15*a*), lo cual indica que se producen cambios a medida que la membrana fluye por la célula. Existen varios factores que pueden propiciar tales cambios (fig. 8-15*b*):

1. La mayor parte de los organelos membranosos contiene enzimas que modifican los lípidos que ya están dentro de su membrana y convierte un tipo de fosfolípidos (p. ej., fosfatidilserina) en otro (p. ej., fosfatidilcolina) (paso 1, fig. 8-15*b*).
2. Cuando las vesículas se desprenden de un compartimiento (como en la figura 8-2*a*), algunos tipos de fosfolípidos pueden incluirse de manera preferencial dentro de la membrana de la vesícula en formación, mientras que otros tipos se dejan atrás (paso 2, fig. 8-15*b*).



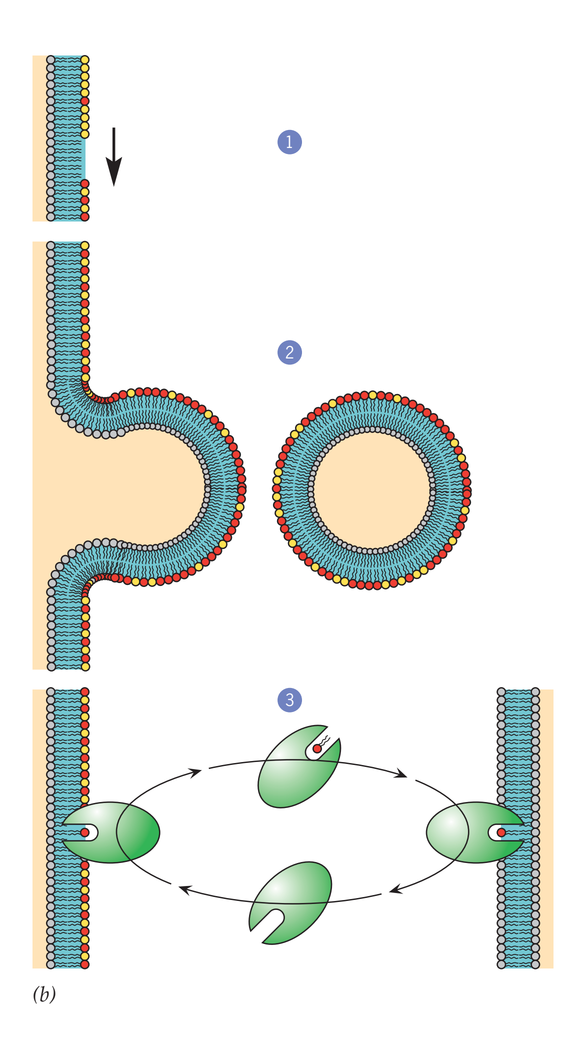


FIGURA 8-15 Modificación de la composición de lípidos de las membranas. *a)* Histograma que indica el porcentaje de cada uno de los tres fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidilserina y esfingomielina) en tres membranas celulares diferentes (ER, aparato de Golgi y membrana plasmática). El porcentaje de cada lípido cambia en forma gradual a medida que la membrana pasa del ER al aparato de Golgi y luego a la membrana plasmática. *b)* Esquema que muestra tres mecanismos distintos que podrían explicar cómo la composición de fosfolípidos de una membrana en un sistema endomembranoso puede ser diferente de otra membrana en el sistema, aunque los compartimientos membranosos tienen una continuación temporal y espacial. 1) Los grupos cabeza de los fosfolípidos de la bicapa se modifican por medios enzimáticos; 2) la membrana de una vesícula en formación contiene una composición distinta de fosfolípidos respecto de la membrana de la que se originó; 3) los fosfolípidos pueden retirarse de una membrana e insertarse en otra mediante proteínas para transferencia de fosfolípidos.

3. Las células contienen *proteínas de transferencia de fosfolípidos* que pueden unirse y transportar a los fosfolípidos *a través del citosol acuoso* de un compartimiento de membrana a otro (paso 3, fig. 8-15*b*). Estas enzimas facilitan el movimiento de fosfolípidos específicos del ER a otros organelos. Esto representa una importancia particular para el traslado de lípidos a los peroxisomas, mitocondrias y cloroplastos, que no son parte del flujo normal de membrana a lo largo de la vía biosintética.

Glucosilación en el retículo endoplásmico rugoso Casi todas las proteínas producidas en los ribosomas unidos con membranas se convierten en glucoproteínas, ya sean componentes integrales de una membrana, enzimas lisosómicas solubles, vacuolares o partes de la matriz extracelular. Los grupos de carbohidratos tienen papeles clave en la función de muchas glucoproteínas, sobre todo como sitios de unión en sus interacciones con otras macromoléculas. También ayudan al plegamiento correcto de la proteína a la que están unidos. Las secuencias de azúcares que comprenden los oligosacáridos de las glucoproteínas son muy específicas; si los oligosacáridos se aíslan de una proteína purificada, su secuencia es consistente y predecible. ¿Cómo se logra el orden de los azúcares en los oligosacáridos?

La adición de azúcares a una cadena de oligosacárido es catalizada por una familia de enzimas unidas a la membrana llamadas **glucosiltransferasas**, que transfieren un monosacárido específico de un azúcar de nucleótido, como GDP-manosa o UDP-*N*-acetilglucosamina (fig. 8-16), al extremo creciente de

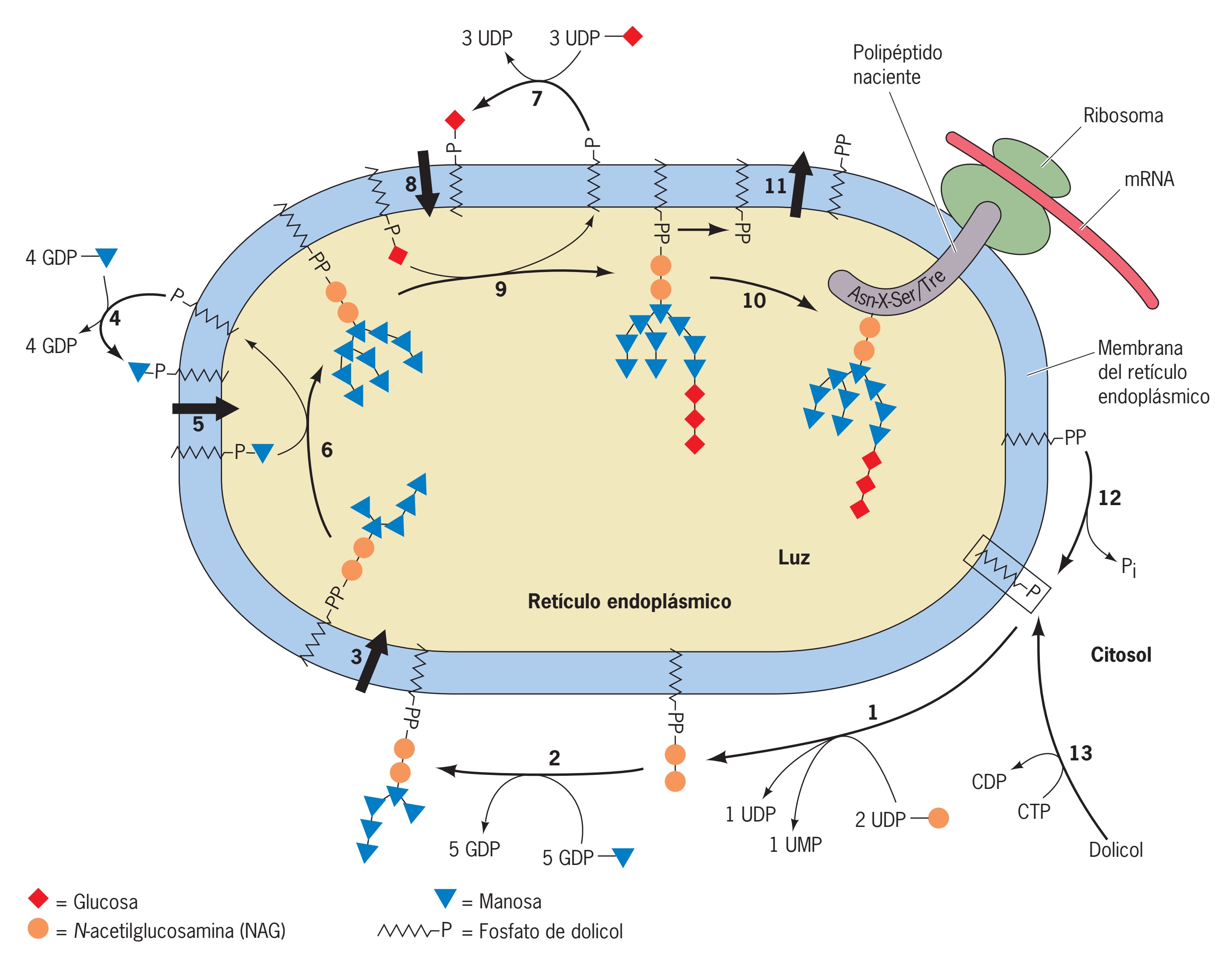


FIGURA 8-16 Los pasos de la síntesis de la porción central de un oligosacárido con enlace *N* en el ER rugoso. Los primeros siete azúcares (cinco manosas y dos residuos de NAG) se transfieren uno a la vez al dolicol-PP en el lado citosólico de la membrana del ER (pasos 1 y 2). En esta etapa, el dolicol con su oligosacárido unido se gira al otro lado de la membrana (paso 3) y los azúcares restantes (cuatro manosas y tres residuos de glucosa) están unidos al lado luminal de la membrana. Estos últimos azúcares se unen de una sola vez en el lado citosólico de la membrana con el extremo de la molécula de fosfato de dolicol (como en los pasos 4 y 7), que luego se gira al otro lado de la membrana (pasos 5 y 8) y cede sus azúcares al extremo creciente de la cadena de oligosacárido (pasos 6 y 9). Una vez que el oligosacárido está ensamblado por completo, se transfiere mediante mecanismos enzimáticos a un residuo de asparagina del polipéptido naciente (paso 10). El dolicol-PP rota de nueva cuenta al otro lado de la membrana (paso 11) y está listo para empezar a aceptar azúcares otra vez (pasos 12 y 13). (Tomada de D. Voet y J. G. Voet, Biochemistry, 2nd ed. © 1995, John Wiley & Sons, Inc. Reimpresa con autorización de John Wiley & Sons, Inc.)

la cadena de carbohidrato. La secuencia en que se transfieren los azúcares durante el ensamblaje de un oligosacárido depende de la secuencia de acción de las glucosiltransferasas que participan en el proceso. A su vez, esto depende de la localización de enzimas específicas dentro de las diversas membranas de la vía secretora. Por lo tanto, la disposición de los azúcares en las cadenas de oligosacáridos de una glucoproteína depende de la localización espacial de las enzimas específicas en la línea de montaje.

La figura 8-16 muestra los pasos iniciales en el ensamble de los oligosacáridos unidos con *N* (a diferencia de los oligosacáridos unidos con *O*, véase fig. 4-10) de las proteínas solubles y las proteínas integrales de la membrana. El segmento basal o central de cada cadena de carbohidrato no se ensambla sobre la proteína misma, sino que se arma independiente sobre un lípido portador y luego se transfiere, en bloque, a los residuos de asparagina específicos del polipéptido. Este lípido portador, llamado **fosfato de dolicol**, está incluido en la membrana del retículo endoplásmico. Los azúcares se agregan a la molécula de fosfato de dolicol uno a la vez por acción de las glucosiltransferasas unidas a la membrana, a partir del paso 1 de la figura 8-16. Esta parte del proceso de glucosilación es invariable; en las células de mamíferos comienza con la transferencia de *N*-acetilglucosamina 1-fosfato, seguida de la transferencia de otra *N*-acetilglucosamina y luego nueve moléculas de manosa y tres unidades de glucosa en el patrón exacto indicado en la figura 8-16. Este bloque de 14 azúcares se transfiere después por efecto de la enzima oligosacariltransferasa del fosfato de dolicol a ciertas asparaginas en el polipéptido naciente (paso 10, fig. 8-16), en tanto que el polipéptido se traslada hacia la luz del retículo endoplásmico.

Las mutaciones que causan la ausencia total de *N*-glucosilación provocan la muerte de los embriones antes de la implantación. Sin embargo, las mutaciones que producen la interrupción parcial de la vía de glucosilación en el retículo endoplásmico causan trastornos hereditarios graves que afectan casi cualquier aparato o sistema. Estas anomalías se conocen como enfermedades congénitas de la glucosilación, o CDG (del inglés *congenital diseases of glycosilation*), y suelen identificarse mediante pruebas sanguíneas que detectan la glucosilación anormal de proteínas séricas. Una de ellas, CDG1b, puede tratarse con medidas muy sencillas. La CDG1b se debe a la deficiencia de la enzima isomerasa de fosfomanosa, que cataliza la conversión de fructosa 6-fosfato en manosa 6-fosfato, una reacción crucial en la vía que hace que la manosa esté disponible para incorporarla en los oligosacáridos. La afección puede tratarse con complementos orales de manosa. Al principio, el tratamiento se probó en un niño que sufría hemorragia gastrointestinal incontrolable, una de las complicaciones frecuentes de la enfermedad. Unos meses después de iniciar el complemento de manosa el niño llevaba una vida normal.

Aunque algunos oligosacáridos, sobre todo en eucariotas inferiores, permanecen como se muestra en la figura 8-16, la evolución de organismos más complejos se acompañó de la diversificación de las secuencias de carbohidrato unidas a las proteínas. La modificación del oligosacárido central comienza en el retículo endoplásmico con la eliminación enzimática de dos de los tres residuos terminales de glucosa (paso 1, fig. 8-17). Esto pone el escenario para un acontecimiento importante en la vida de una glucoproteína recién sintetizada en el cual ésta es evaluada por un sistema de **control de calidad** que determina si es apta o no para pasar al siguiente compartimiento de la vía biosintética. Para comenzar este proceso de detección, cada glucoproteína (que en esta etapa contiene una sola glucosa restante) se une a la carabina del retículo endoplásmico (calnexina o calreticulina) (paso 2). La eliminación de la glucosa restante por la glucosidasa II hace que la carabina libere la glucoproteína (paso 3). Si una glucoproteína en esta etapa no completó su plegamiento o está mal plegada, una "enzima de vigilancia" (llamada GT) la reconoce y le agrega un solo residuo de glucosa a uno de los residuos de manosa en el extremo expuesto del oligosacárido recién ajustado (paso 4). La GT reconoce las proteínas mal plegadas, o plegadas sólo de forma parcial, porque exponen residuos hidrófobos que no se detectan en las proteínas bien plegadas. Una vez que se agrega el residuo de glucosa, las mismas moléculas chaperonas reconocen a la glucoproteína "marcada", lo que da a la proteína otra oportunidad para plegarse de manera correcta (paso 5). Después de un periodo con la molécula chaperona, el residuo adicional de glucosa se retira y la "enzima de vigilancia" la revisa de nueva cuenta para confirmar si ya tiene su estructura tridimensional apropiada. Si aún está plegada de forma incompleta, se agrega otro residuo de glucosa y el proceso se repite hasta que al final la glucoproteína se pliega

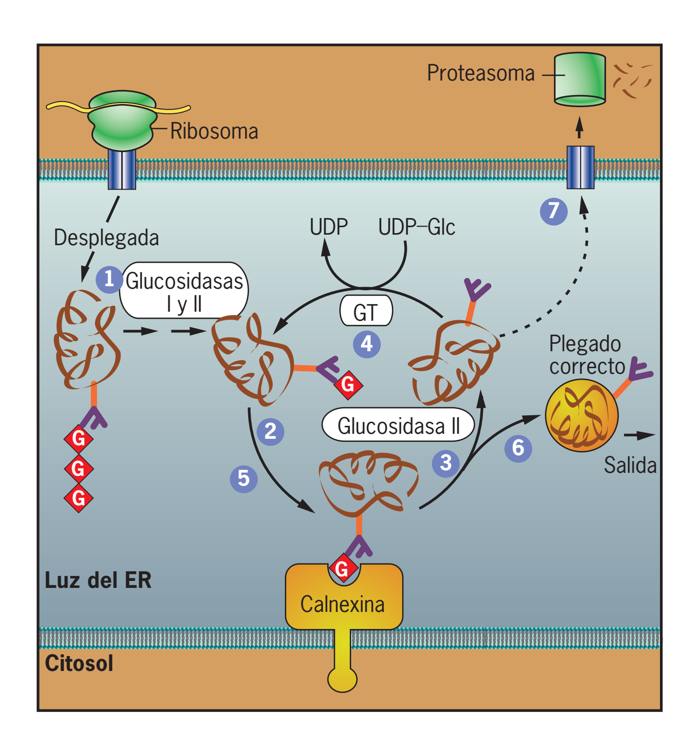


FIGURA 8-17 Control de calidad: confirmación de que las proteínas mal plegadas no salen del ER. Con base en este mecanismo propuesto, una glucosiltransferasa (GT) reconoce las proteínas mal plegadas y les agrega una glucosa al extremo de las cadenas de oligosacárido. La chaperona calnexina reconoce a las glucoproteínas que contienen oligosacáridos monoglucosilados y les da la oportunidad de alcanzar su estado correcto de plegamiento (nativo). Si esto no ocurre después de varios intentos, la proteína se traslada al citosol y se destruye. Los pasos se describen en el texto. (TOMADA DE L. ELLGAARD ET AL., SCIENCE 286:1884, 1999; © 1999, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE.)

de modo correcto y continúa su camino (paso 6) o permanece mal plegada, o bien se destruye (paso 7).

Se retoma la historia de la glucosilación de las proteínas en la página 296, cuando se describa la manera en que el oligosacárido que se ensambló en el retículo endoplásmico crece a su paso por el aparato de Golgi en su camino por la vía biosintética.

Mecanismos que aseguran la destrucción de las proteínas mal plegadas Recién se describió el modo en que las enzimas del retículo endoplásmico identifican las proteínas que no se pliegan de manera apropiada. Fue una sorpresa descubrir que las proteínas mal plegadas no se destruyen en el retículo endoplásmico, sino que se transportan al citosol por un proceso de "transposición inversa". Sigue siendo incierta la manera en que las proteínas mal plegadas son llevadas de regreso (transposición inversa) al citosol a través de los translocones por los que pasaron en su camino a la luz del retículo endoplásmico o por medio de un canal de transposición inversa separado de identidad incierta. Una vez en el citosol, las cadenas de oligosacáridos se retiran y las proteínas mal plegadas se degradan en los proteasomas, que son máquinas destructoras de proteínas cuya estructura y función se describen en la sección 12.7. Este proceso, conocido como *degradación vinculada al retículo endoplásmico* (*ERAD*, del inglés *ER-associated degradation*), asegura que las proteínas aberrantes no sean transportadas a otras partes de la célula, pero puede tener consecuencias negativas. En casos graves de fibrosis quística, la membrana plasmática de las células epiteliales carece de la proteína codificada por el gen de la fibrosis quística (pág. 160). En todos estos casos, la proteína mutante es destruida en el proceso de control de calidad del retículo endoplásmico, por lo que no llega a la superficie celular.

En ciertas circunstancias, las proteínas mal plegadas pueden generarse en el retículo endoplásmico a mayor velocidad de la que pueden transportarse al citoplasma. La acumulación de proteínas mal plegadas, que puede ser fatal para la célula, inicia un "plan de acción" completo dentro de la célula que se conoce como **respuesta de proteína no plegada (UPR)**. El retículo endoplásmico contiene sensores de proteína que vigilan la concentración de proteínas no plegadas o mal plegadas en la luz del ER. De acuerdo con una propuesta presentada en la figura 8-18, los sensores se mantienen en estado inactivo por chaperones moleculares, en especial BiP. Si las circunstancias conducen a la acumulación de proteínas mal plegadas, las moléculas BiP de la luz del retículo endoplásmico se reclutan al servicio como chaperonas para las proteínas defectuosas, lo que las hace incapaces de inhibir a los sensores. La activación de los sensores da origen a una multitud de señales que se transmiten hacia el núcleo y el citosol y el resultado incluye lo siguiente.

- Expresión de cientos de genes diferentes cuyas proteínas codificadas tienen la capacidad de aliviar las condiciones de estrés dentro del retículo endoplásmico. Se incluyen genes que codifican a) chaperonas moleculares con base en el retículo endoplásmico que ayudan a las proteínas mal plegadas a alcanzar su estado nativo; b) proteínas que intervienen en el transporte de proteínas fuera del ER, y c) proteínas que participan en la destrucción selectiva de proteínas anormales, como se mencionó antes.
- Fosforilación de una proteína clave (eIF2α) necesaria para la síntesis de proteína. Esta modificación inhibe la síntesis proteica y disminuye el flujo de proteínas nuevas al retículo

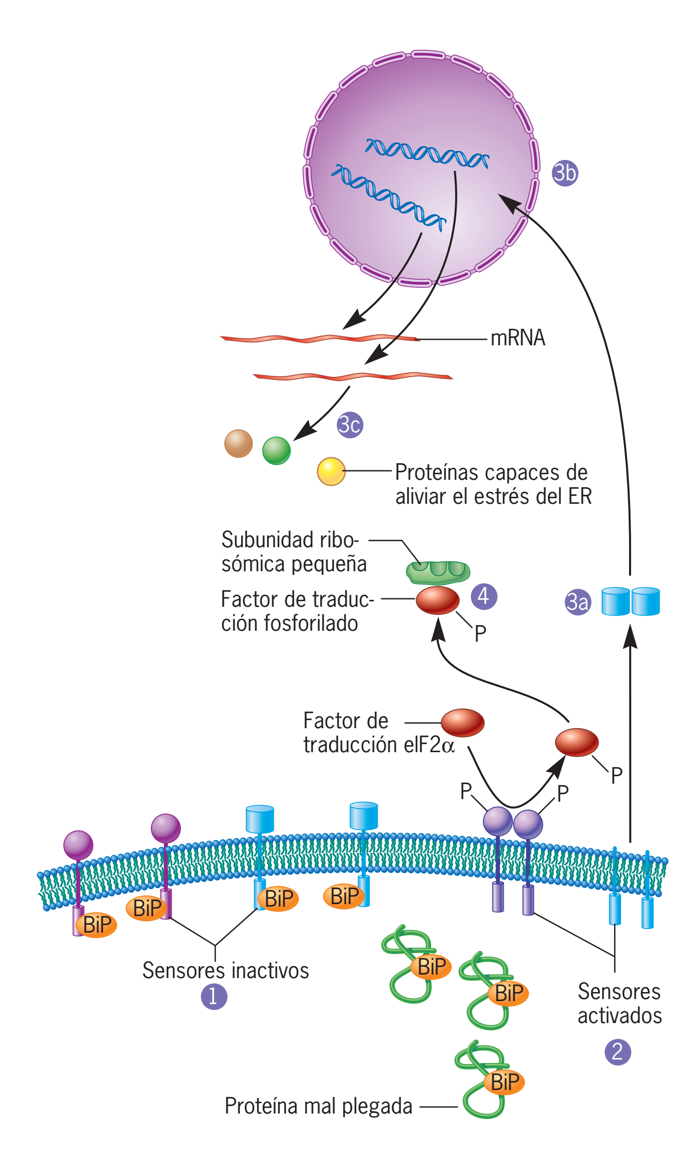


FIGURA 8-18 Un modelo de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) de los mamíferos. El ER contiene proteínas transmembranosas que funcionan como sensores de los fenómenos que ocurren en la luz del ER. En condiciones normales, estos sensores se encuentran en estado monomérico inactivo como resultado de su relación con moléculas chaperonas, en especial BiP (paso 1). Si el número de proteínas desplegadas alcanzara un nivel alto, se congregan las moléculas chaperonas para ayudar al plegado de las proteínas, lo cual las separa de su relación con los sensores y permite que éstos formen dímeros. Después de la dimerización hay fosforilación de un tipo de sensor y separación del dominio citosólico del otro tipo de sensor, lo que conduce a su activación (paso 2). Una vez activados, los sensores emiten señales a otras partes de la célula. En la figura se indican dos tipos de señales; existe un tercer tipo, que no se muestra. La porción citosólica de un tipo de sensor se difunde por el citosol (paso 3a) y hacia el núcleo (paso 3b), donde estimula la expresión de genes cuyas proteínas codificadas pueden aliviar el estrés en el ER (paso 3c). Estas proteínas incluyen chaperonas, proteínas de cubierta que se forman sobre vesículas de transporte y proteínas de los mecanismos para el control de calidad. El paso 4 muestra un tipo diferente de señal en la que el sensor activado del ER tiene una proteína fosforilada (eIF2α) que se necesita para iniciar la síntesis de proteínas. Este factor de traducción se halla inactivo en el estado fosforilado, lo cual impide que la célula sintetice más proteínas en el ER y suministra más tiempo a la célula para procesar las proteínas que ya están en la luz del retículo endoplásmico.

endoplásmico. Esto suministra a la célula una oportunidad de retirar las proteínas que ya están en la luz del retículo endoplásmico.

Un dato interesante es que la respuesta a la proteína no plegada es más que un mecanismo de supervivencia celular; también incluye la activación de una vía que conduce a la muerte de la célula. Se presupone que la reacción a la proteína no plegada confiere un mecanismo para aliviar a la célula de condiciones de estrés. Si estas medidas correctivas no tienen éxito, se activa la vía de muerte celular y la célula se destruye.

Del retículo endoplásmico al aparato de Golgi: primer paso en el transporte vesicular

Los sitios de salida de las cisternas del RER están desprovistos de ribosomas, y en ellos se forman las primeras vesículas de transporte de la vía biosintética. El viaje desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi puede seguirse en forma visual en células vivas si las proteínas secretoras se marcan con la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *green fluorescent protein*), como se describe en la página 277. Con ésta y otras técnicas se descubrió que en cuanto se desprenden de la membrana del retículo endoplásmico, las vesículas de transporte se fusionan unas con otras para formar vesículas más grandes y túbulos interconectados en la región entre el ER y el aparato de Golgi. Esta región se llamó *ERGIC* (del inglés e*ndoplasmic* r*eticulum* G*olgi* i*ntermediate* c*ompartment*, compartimiento intermedio entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi), y los transportadores vesiculotubulares que se forman en él se denominaron *VTC* (del inglés *vesicular-tubular carrier*) (véase fig. 8-25*a*). Una vez formados, los VTC se alejan del retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi. La figura 8-19 muestra el movimiento de dos de estos transportadores membranosos vesiculotubulares del ERGIC al aparato de Golgi. El movimiento de los VTR ocurre sobre rieles compuestos por microtúbulos.

REVISIÓN ?

1. ¿Cuáles son las principales diferencias morfológicas entre el RER y el SER y cuáles son sus funciones?
2. Describa los pasos que ocurren entre el momento en que el ribosoma se une con un RNA mensajero que codifica una proteína secretora y el momento en que la proteína sale del retículo endoplásmico rugoso.
3. ¿Cómo se insertan las proteínas recién sintetizadas en una membrana?
4. Describa algunas de las formas en que los organelos membranosos pueden mantener su composición única a pesar del tránsito continuo de membranas y materiales a través de ellos.
5. Describa cómo se mantiene la asimetría de la membrana conforme ésta se mueve del retículo endoplásmico a la membrana plasmática.
6. Describa los mecanismos por los cuales la célula asegura que las proteínas mal plegadas: a) no salgan del retículo endoplásmico y b) no se acumulen hasta niveles excesivos dentro de la luz del retículo endoplásmico.

8.4 EL APARATO DE GOLGI

En los últimos años del siglo XIX, un biólogo italiano, Camillo Golgi, inventó nuevos procedimientos de tinción para revelar la organización de las células nerviosas dentro del sistema nervioso central. En 1898, Golgi aplicó una tinción metálica a las células nerviosas del cerebelo y descubrió una red teñida de oscuro localizada cerca del núcleo celular. Esta red, que más tarde se identificó en otros tipos celulares y se llamó **aparato de Golgi**, llevó a su descubridor a obtener el premio Nobel en 1906. El aparato de Golgi permaneció como centro de controversia durante decenios entre los que creían que el organelo existía en las células vivas y los que pensaban que era un *artefacto*, es decir, una estructura artificial formada durante la preparación para el estudio microscópico. No fue sino hasta que el aparato de Golgi se identificó con claridad en células sin fijación, preparadas por congelamiento y fractura (véase fig. 18-17) que se comprobó su existencia más allá de cualquier duda razonable.

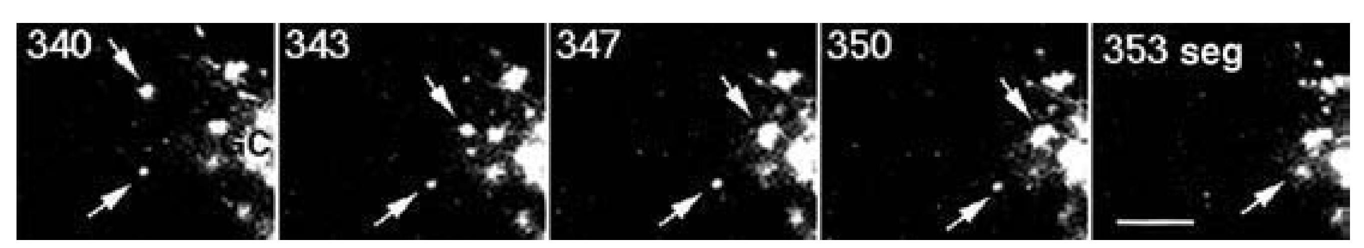


FIGURA 8-19 Visualización del tránsito de membrana con el uso de una marca fluorescente. Esta serie de fotografías muestra una pequeña porción de una célula viva de mamífero que se infectó con el virus de la estomatitis vesicular (VSV) que contiene el gen quimérico *VSVG-GFP* (pág. 278). Una vez que se sintetiza en el ER rugoso, la proteína de fusión emite una fluorescencia verde que puede seguirse conforme la proteína se mueve por la célula. En la serie de fotografías que se muestran, dos portadores vesiculotubulares (flechas) que contienen la proteína fluorescente se desprendieron del ER y se mueven hacia el aparato de Golgi (GC). La serie de fenómenos representados tienen lugar en un periodo de 13 segundos. La barra representa 6 μm. (Reimpresa con autorización de John F. Presley et al., Nature 389:82, 1997; © 1997, Macmillan Magazines, Ltd.)

El aparato de Golgi tiene una morfología característica, consistente sobre todo en cisternas membranosas aplanadas, parecidas a discos, con bordes dilatados, vesículas y túbulos relacionados (fig. 8-20*a*). Las cisternas, cuyos diámetros típicos oscilan entre 0.5 y 1.0 μm, están dispuestas en una pila ordenada, muy parecida a una superposición de hojuelas, y curvadas de

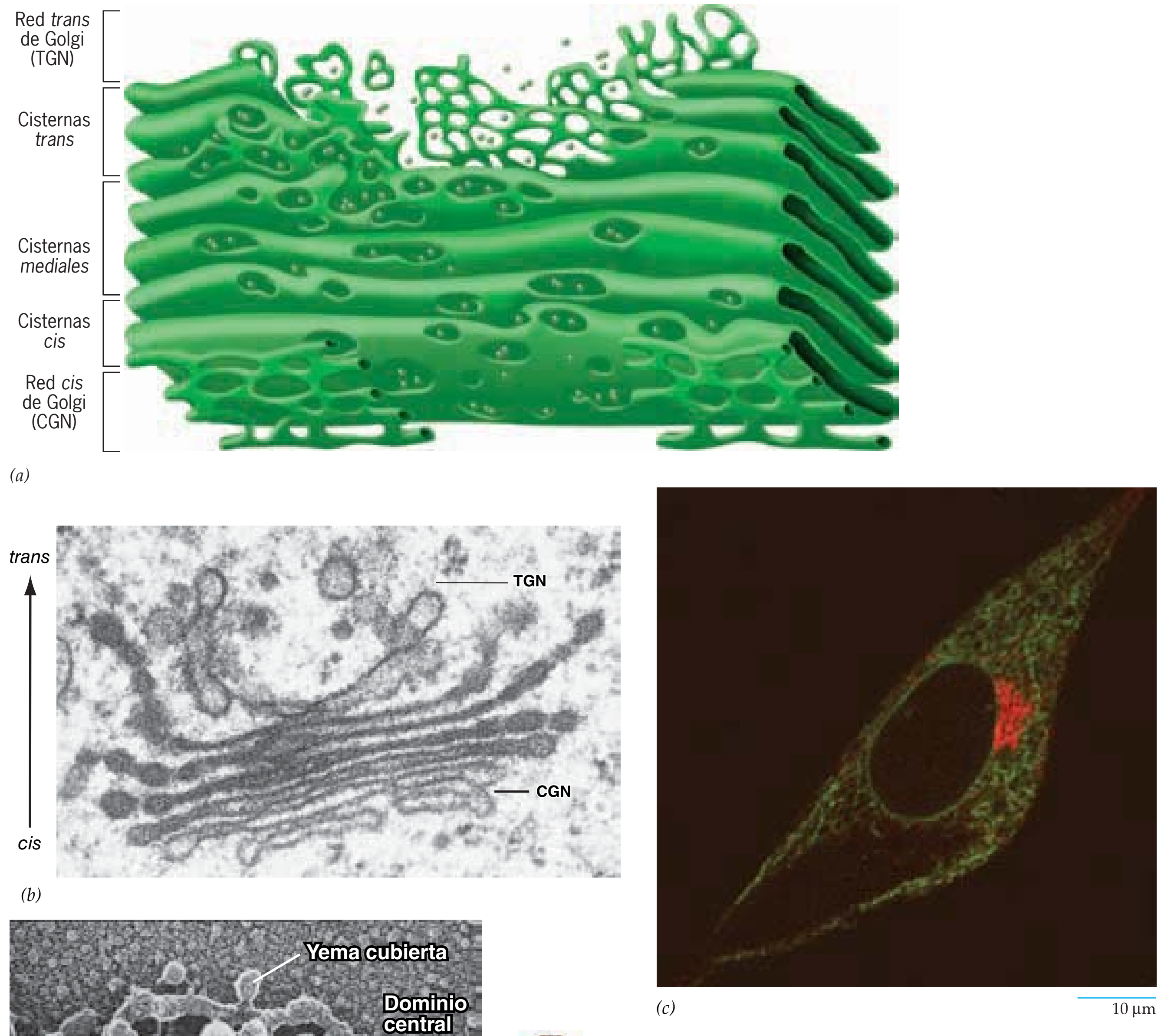


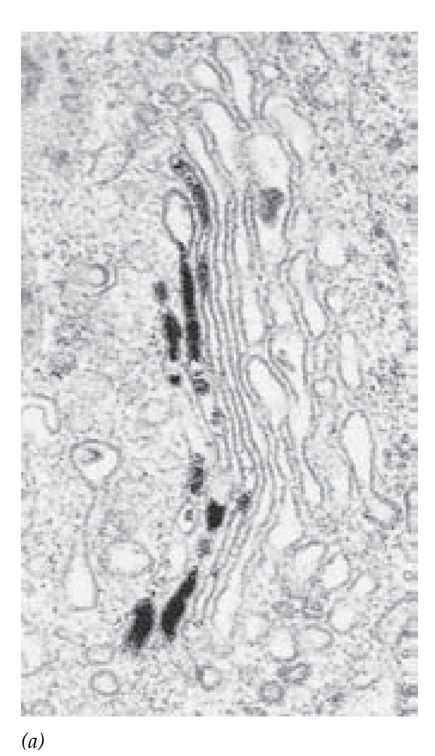
FIGURA 8-20 El aparato de Golgi. *a*) Modelo esquemático de una porción de un aparato de Golgi de una célula epitelial del aparato reproductor masculino de la rata. Los elementos de los compartimientos *cis* y *trans* a menudo son discontinuos y se ven como redes tubulares. *b*) Micrografía electrónica de una porción de una célula de tapa radicular de tabaco que muestra la polaridad *cis* a *trans* de la pila de Golgi. *c*) Micrografía de fluorescencia de una célula de mamífero cultivada. La posición del aparato de Golgi se revela por la fluorescencia roja, que marca la localización de anticuerpos contra una proteína de la cubierta COP-I. *d*) Micrografía electrónica de una sola cisterna de Golgi que muestra dos dominios distintos, un dominio central cóncavo y un dominio periférico irregular. El dominio periférico consiste en una red tubular de la cual se desprenden yemas cubiertas con proteína. (*A*, TOMADA DE A. RAMBOURG E Y. CLERMONT. EUR J CELL BIOL 51:195, 1990; *B*, CORTESÍA DE THOMAS H. GIDDINGS; *C*, TOMADA DE ANDREI V. NIKONOV, ET AL., J CELL BIOL 158:500, 2002; CORTESÍA DE GERT KREIBICH CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, DE PEGGY J. WEIDMAN Y JOHN HEUSER, TRENDS CELL BIOL 5:303, 1995; © 1995, CON AUTORIZACIÓN DE ELSEVIER SCIENCE.)

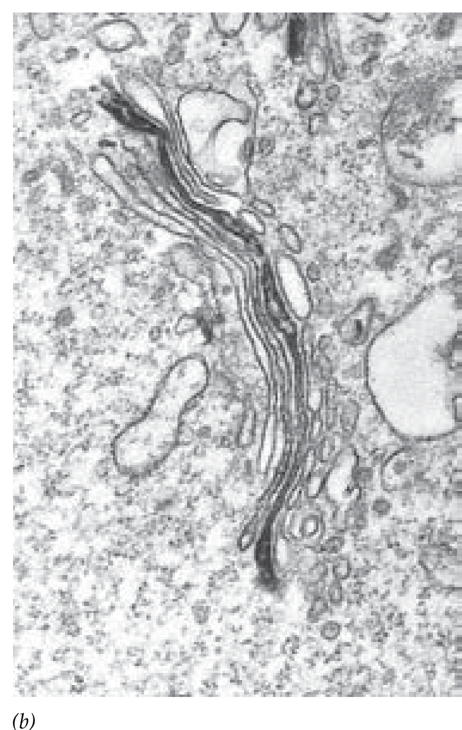
tal forma que semejan un tazón poco profundo (fig. 8-20*b*).[4] Por lo general, una pila de Golgi contiene menos de ocho cisternas. Una célula individual puede contener desde unas cuantas hasta varios miles de pilas distintas, según sea el tipo de célula. Las pilas de Golgi en las células de los mamíferos están conectadas entre sí por túbulos membranosos para formar un solo complejo grande parecido a un listón situado junto al núcleo de la célula (fig. 8-20*c*). Una mirada más cercana a una cisterna individual sugiere que las vesículas se desprenden de un dominio tubular periférico de cada cisterna (fig. 8-20*d*). Como se explicó antes, muchas de estas vesículas contienen una cubierta proteica distintiva que puede verse en la figura 8-20*d*.

El aparato de Golgi se divide en varios compartimientos con funciones diferentes dispuestos a lo largo de un eje, desde la cara *cis*, o de entrada más cercana al ER, hasta la cara *trans* o de salida, en el lado opuesto de la pila (fig. 8-20*a*, *b*). La cara más *cis* del organelo la forma una red de túbulos conectados entre sí que se conoce como **red *cis* de Golgi (CGN)**. Se cree que la CGN funciona sobre todo como una estación de clasificación que distingue entre las proteínas que deben enviarse de regreso al retículo endoplásmico (pág. 299) y aquellas a las que se les permite avanzar a la siguiente estación de Golgi. La mayor parte del aparato de Golgi consiste en una serie de cisternas grandes y aplanadas que se dividen en **cisternas *cis***, ***mediales*** y ***trans*** (fig. 8-20*a*). La cara más *trans* del organelo contiene una red distintiva de túbulos y vesículas llamada **red *trans* de Golgi (TGN)**. Al igual que la CGN, la TGN también es una estación clasificadora. Las proteínas se separan en la TGN en tipos diferentes de vesículas que se dirigen a la membrana plasmática o a varios destinos intracelulares. Se cree que los elementos membranosos del aparato de Golgi cuentan con el soporte mecánico de un esqueleto periférico de la membrana o andamiaje compuesto por varias proteínas, incluidas integrantes de las familias de la espectrina, anquirina y actina, proteínas que también están presentes como parte del esqueleto de la membrana plasmática (pág. 146). La estructura de Golgi puede mantener un enlace físico con proteínas motoras que dirigen el movimiento de las vesículas y túbulos que entran y salen del aparato de Golgi. Se piensa que un grupo separado de proteínas fibrosas forma una "matriz" de Golgi que tiene un papel clave en el desarmado y rearmado del aparato de Golgi durante la mitosis.

La figura 8-21 muestra evidencia visual de que el aparato de Golgi no tiene una composición uniforme de un extremo al otro. Las diferencias en la composición de los compartimientos de membrana desde la cara *cis* a la *trans* reflejan el hecho de que el aparato de Golgi es sobre todo una "planta procesadora". Las proteínas de membrana recién sintetizadas, así como las proteínas secretoras y lisosómicas, salen del ER y entran al aparato de Golgi por su cara *cis* y luego pasan a través de la pila hasta la

[4] Algunas veces, una sola pila de Golgi en las células vegetales se llama *dictiosoma.*


(*a*)


(*b*)

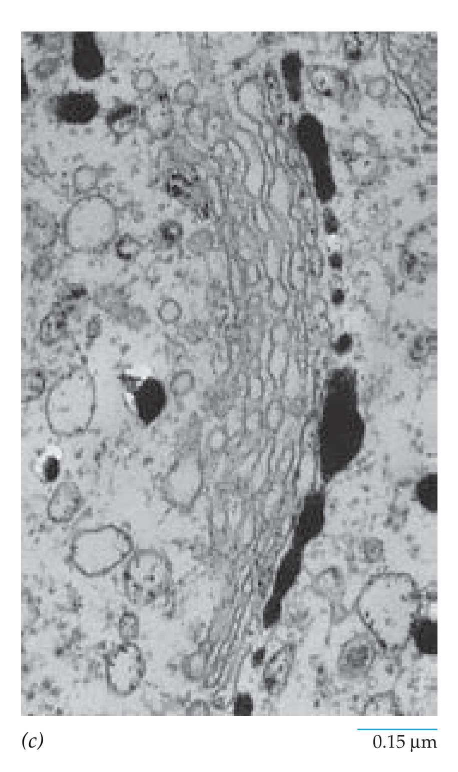

(*c*)

FIGURA 8-21 Diferencias regionales en la composición de la membrana a través de la pila de Golgi. *a*) El tetróxido de osmio reducido se impregna en forma preferencial a las cisternas *cis* del aparato de Golgi. *b*) La enzima manosidasa II, que participa en el ajuste de los residuos de manosa del oligosacárido central como se describe en el texto, se localiza sobre todo en las cisternas *medias*. *c*) La enzima difosfatasa de nucleósido, que separa los dinucleótidos (p. ej., UDP) después de donar su azúcar, se ubica de forma preferencial en las cisternas *trans*. (*A* y *C*, tomadas de Robert S. Decker, J Cell Biol 61:603, 1974; *B*, tomada de Angel Velasco et al., J Cell Biol 122:41, 1993. Todas con autorización de los derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

cara *trans*. Conforme avanzan por la pila, las proteínas originales sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso sufren varias modificaciones específicas. En la actividad del aparato de Golgi mejor estudiada, los carbohidratos de la proteína se modifican por una serie de reacciones enzimáticas secuenciales, como se describe en la siguiente sección.

Glucosilación en el aparato de Golgi

El aparato de Golgi tiene una función esencial en el ensamble del componente carbohidrato de las glucoproteínas y glucolípidos. Cuando se interrumpió de forma momentánea el tema de la síntesis de cadenas de carbohidratos con enlaces *N* en la página 291, los residuos de glucosa acababan de retirarse de los extremos del oligosacárido central. Conforme las nuevas glucoproteínas solubles y de membrana pasan por las cisternas *cis* y *media* de la pila de Golgi, la mayor parte de los residuos de manosa también se retira de los oligosacáridos centrales y se agregan otros azúcares en forma secuencial por acción de varias glucosiltransferasas.

En el aparato de Golgi, como en el retículo endoplásmico rugoso, la secuencia en la que se incorporan los azúcares en los oligosacáridos depende de la disposición espacial de las glucosiltransferasas específicas que entran en contacto con la proteína recién sintetizada a medida que se mueve por la pila de Golgi. Por ejemplo, la enzima transferasa de sialilo, que coloca un ácido siálico en la posición terminal de la cadena en células animales, se localiza en el extremo *trans* de la pila de Golgi, como era de esperarse si las glucoproteínas nuevas se movieran de manera continua hacia esta parte del organelo. En cambio con los fenómenos de glucosilación que ocurren en el retículo endoplásmico, que acoplan un solo oligosacárido central, los pasos de la glucosilación en el aparato de Golgi pueden ser muy variados y producen dominios de carbohidrato con una notable diversidad en la secuencia. Una de las muchas vías posibles de glucosilación se muestra en la figura 8-22. A diferencia de los oligosacáridos con enlaces *N*, cuya síntesis comienza en el retículo endoplásmico, los unidos con proteínas mediante enlaces *O* (fig. 4-10) se articulan dentro del aparato de Golgi.

El aparato de Golgi también es el sitio donde se sintetiza la mayoría de los polisacáridos complejos de la célula, incluidas las cadenas de glucosaminoglucanos del proteoglucano que se muestran en la figura 7-9*a*, así como las pectinas y hemicelulosa de las paredes celulares de las plantas (véase fig. 7-37*c*).

El movimiento de materiales a través del aparato de Golgi

Desde hace mucho ya se estableció que los materiales se mueven por los diversos compartimientos del aparato de Golgi; empero, dos nociones de la manera en que esto ocurre han dominado el campo durante años. Hasta mediados del decenio de 1980 se aceptaba en general que las cisternas de Golgi eran estructuras transitorias. Se presuponía que las cisternas de Golgi formaban la cara *cis* de la pila mediante la fusión de los portadores membranosos desde el retículo endoplásmico y el ERGIC y que cada cisterna se movía físicamente desde el extremo *cis* al *trans* de la pila y cambiaba de composición conforme avanzaba. Esto se conoce como el *modelo de maduración de las cisternas* porque, de acuerdo con el modelo, cada cisterna "madura" a lo largo de la pila.

De mediados del decenio de 1980 a mitad de la década de 1990, el modelo de maduración del movimiento de Golgi casi se abandonó y se sustituyó por un modelo alternativo que proponía que las cisternas de una pila de Golgi permanecían en su sitio como compartimientos estables. En este último modelo, que se conoce como *modelo de transporte vesicular*, el cargamento (proteínas secretoras, lisosómicas y de membrana) se lanza a través de la pila de Golgi, desde la CGN hasta la TGN, en vesículas que se desprenden de un compartimiento de membrana y se fusionan con un compartimiento contiguo más avanzado en la pila. El modelo de transporte vesicular se ilustra en la figura 8-23*a* y su aceptación depende sobre todo de dos tipos de observaciones:

1. Cada una de las diversas cisternas de Golgi de una pila tiene una población distinta de enzimas residentes (fig. 8-21).

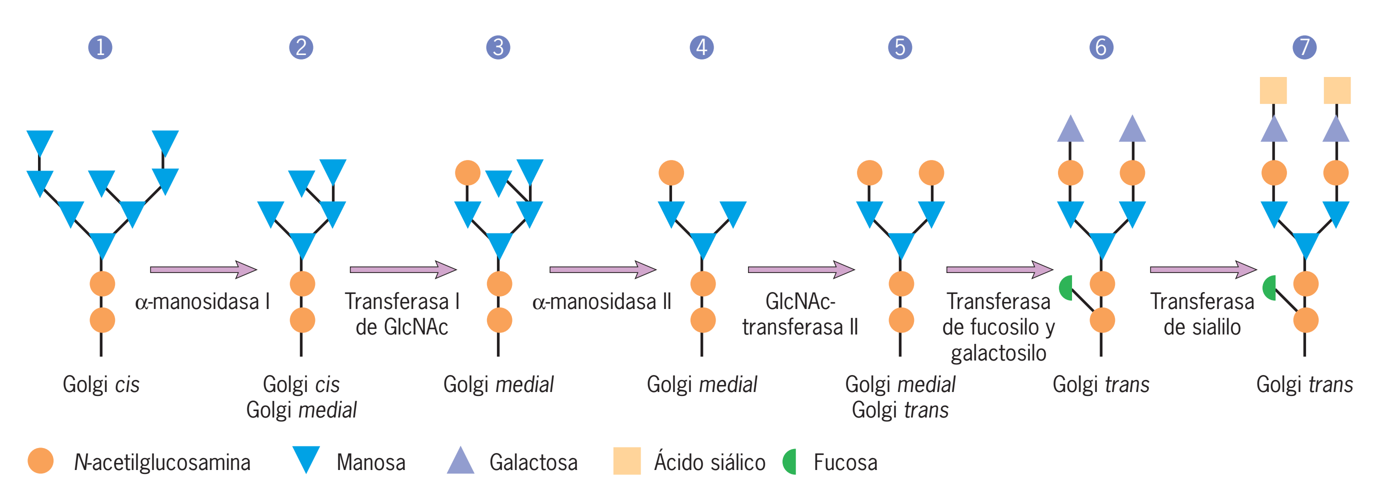
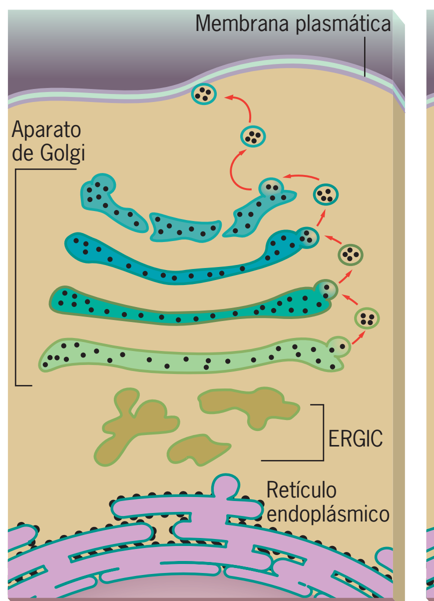
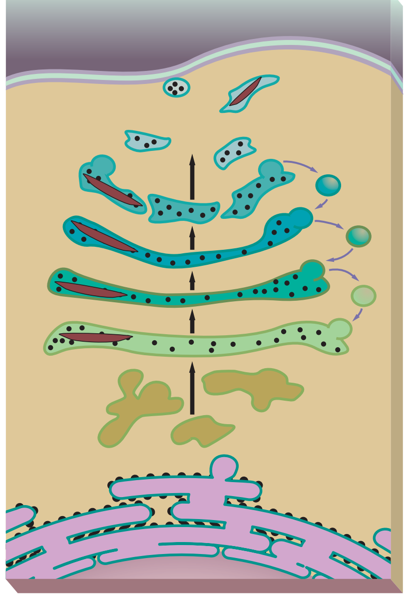


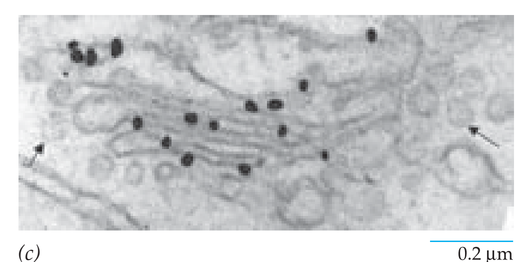
FIGURA 8-22 Pasos en la glucosilación de un oligosacárido con enlace *N* de mamífero típico en el aparato de Golgi. Después del retiro de los tres residuos de glucosa, varios residuos de manosa se eliminan, mientras diversos azúcares (*N*-acetilglucosamina, galactosa, fucosa y ácido siálico) se agregan al oligosacárido por acción de glucosiltransferasas específicas. Estas enzimas son proteínas integrales de la membrana cuyos sitios activos están dirigidos hacia las cisternas de Golgi. Esta es sólo una de las numerosas vías de glucosilación.



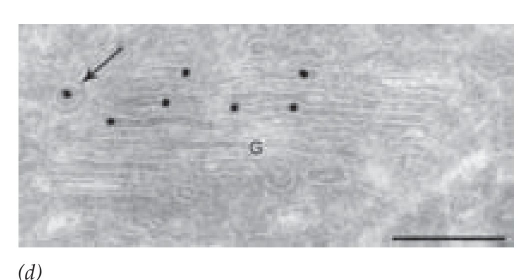
(a) Modelo de transporte vesicular



(b) Modelo de maduración de cisternas



(c) 0.2 μm



(d)

FIGURA 8-23 La dinámica del transporte por el aparato de Golgi. *a)* En el modelo de transporte vesicular, el cargamento (puntos negros) se lleva en sentido anterógrado en vesículas de transporte, mientras que las cisternas mismas permanecen como elementos estables. *b)* En el modelo de maduración de cisternas, éstas progresan en forma gradual de la posición *cis* a la *trans* y luego se dispersan en la TGN. Las vesículas de transporte llevan enzimas residentes de Golgi (indicadas por las vesículas de color) en sentido retrógrado. Los objetos con forma de lente representan grandes materiales de cargamento, como los complejos de procolágena de los fibroblastos. *c)* Micrografía electrónica de un área del aparato de Golgi en un corte congelado delgado de una célula que se infectó con el virus de la estomatitis vesicular (VSV). Los puntos negros son partículas de oro nanométricas unidas mediante anticuerpos a la proteína VSVG, una molécula de cargamento anterógrado. El cargamento se limita a las cisternas y no aparece en las vesículas cercanas (flechas). *d)* Micrografía electrónica similar a *c* pero en este caso las partículas de oro no están unidas al cargamento, sino a la manosidasa II, una enzima residente de las cisternas *mediales* de Golgi. La enzima aparece en una vesícula (flecha) y en las cisternas. Se presume que la vesícula marcada transporta la enzima en sentido retrógrado para compensar el movimiento de avance de la enzima como resultado de la maduración de las cisternas. La barra representa 0.2 μm. (*C*, TOMADA DE ALEXANDER A. MIRONOV ET AL., CORTESÍA DE ALBERTO LUINI, J CELL BIOL 155:1234, 2001; *D*, TOMADA DE JOSÉ A. MARTÍNEZ MENÁRGUEZ, ET AL., CORTESÍA DE JUDITH KLUMPERMAN, J CELL BIOL 155:1214, 2001. AMBAS CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

¿Cómo podrían las diversas cisternas tener propiedades tan diferentes si cada cisterna diera origen a la que le sigue en la línea, como lo sugería el modelo de maduración de cisternas?

2. Utilizando el microscopio electrónico es posible reconocer grandes cantidades de vesículas que se desprenden de los bordes de las cisternas de Golgi. En 1983, James Rothman y sus colegas de la *Stanford University* usaron preparaciones de membranas de Golgi acelulares (pág. 280) para demostrar que las vesículas de transporte pueden desprenderse de las cisternas de Golgi y fusionarse con otra cisterna in vitro. Este experimento crucial estableció la base para una hipótesis que sugería que dentro de la célula las vesículas que llevan cargamento se desprendían de cisternas *cis* y se fusionaban con otras situadas en posición más *trans* en la pila.

Aunque ambos modelos de la función de Golgi todavía tienen defensores, el consenso de opinión regresó al modelo de maduración de cisternas. Algunas de las principales razones para este cambio son las siguientes:

- El modelo de maduración de las cisternas contempla un aparato de Golgi altamente dinámico en el cual los principales elementos del organelo, las cisternas, se forman continuamente en la cara *cis* y se dispersan a la cara *trans*. Según esta idea, la existencia misma del aparato de Golgi en sí depende del influjo continuo de transportadores desde el retículo endoplásmico y el ERGIC. Como lo predice este modelo, cuando la formación de transportadores en el retículo endoplásmico es bloqueada por tratamiento de las células con fármacos específicos o por el uso de mutantes sensibles a la temperatura (pág. 279), el aparato de Golgi simplemente desaparece. Cuando se retira el fármaco o las células mutantes vuelven a colocarse a temperaturas propicias, el aparato de Golgi se reensambla con rapidez a medida que se renueva el transporte desde el retículo endoplásmico.
- Se puede demostrar que ciertos materiales que se producen en el retículo endoplásmico y viajan por el aparato de Golgi permanecen en las cisternas de Golgi y nunca aparecen dentro de las vesículas de transporte relacionadas con el aparato de Golgi. Por ejemplo, los estudios con fibroblastos indican que grandes complejos de moléculas de procolágena (precursores de la colágena extracelular) se mueven de las cisternas *cis* a las *trans* sin salir nunca de la luz de la cisterna.
- Hasta mediados del decenio de 1990 se asumió que las vesículas de transporte siempre se movían en sentido *anterógrado* (*adelante*), esto es, de un origen *cis* a un destino más *trans*.

No obstante, una gran cantidad de evidencia indicó que las vesículas pueden moverse en sentido retrógrado (*hacia atrás*), es decir, de una membrana donante *trans* a una membrana receptora *cis*.

- Estudios con células de levadura vivas en gemación que contenían proteínas de Golgi con tinción fluorescente han mostrado de manera directa que la composición de una cisterna de Golgi individual puede cambiar con el tiempo: desde una que contiene proteínas residentes tempranas de Golgi (*cis*) hasta una con proteínas residentes tardías de Golgi (*trans*). Los resultados de este experimento se muestran en la micrografía que abre el capítulo 18 y no son compatibles con el modelo de transporte vesicular. Queda por determinar si estos resultados obtenidos en levaduras pueden extrapolarse al aparato de Golgi de los mamíferos, que tiene una estructura en palizada más compleja.

En la figura 8-23*b* se presenta una versión actual del modelo de maduración de las cisternas. A diferencia de las versiones originales del modelo de maduración de cisternas, la versión que se muestra en la figura 8-23*b* reconoce el papel de las vesículas de transporte, de las cuales ya se demostró que se desprenden de las membranas de Golgi. Sin embargo, en este modelo estas vesículas de transporte no lanzan el cargamento en sentido anterógrado, sino que transportan las enzimas residentes de Golgi en sentido retrógrado. Este modelo de transporte en el aparato de Golgi cuenta con el apoyo de las micrografías electrónicas del tipo ilustrado en la figura 8-23*c*, *d*. Estas micrografías muestran cortes ultradelgados de células de mamífero cultivadas, que se cortaron de un bloque congelado. En ambos casos, los cortes congelados se trataron con anticuerpos que estaban unidos con partículas de oro antes del examen al microscopio electrónico. La figura 8-23*c* presenta un corte a través del aparato de Golgi después del tratamiento con anticuerpos marcados con oro que se unen con una proteína del cargamento, en este caso la proteína viral VSVG (pág. 278). Las moléculas de VSVG se hallan dentro de las cisternas, pero no en las vesículas cercanas (flechas), lo que indica que el cargamento se traslada en sentido anterógrado dentro de las cisternas en maduración, pero no dentro de pequeñas vesículas de transporte. La figura 8-23*d* muestra un corte a través de un aparato de Golgi después del tratamiento con anticuerpos marcados con oro que se unen con una proteína residente del aparato de Golgi, en este caso la enzima procesadora manosidasa II. A diferencia de la proteína de cargamento VSVG, las moléculas de manosidasa II se encuentran en las cisternas y las vesículas relacionadas (flecha), lo cual apoya la propuesta de que estas vesículas se usan para transportar enzimas residentes de Golgi en sentido retrógrado.

El modelo de maduración de cisternas que se muestra en la figura 8-23*b* explica cómo las diferentes cisternas de Golgi en una pila pueden tener una identidad única. Por ejemplo, una enzima como la manosidasa II, que retira residuos de manosa de los oligosacáridos y se limita casi del todo a las cisternas *medias* (fig. 8-21), puede reciclarse hacia atrás en vesículas de transporte a medida que cada cisterna avanza hacia el extremo *trans* de la pila. Hay que señalar que varios de los investigadores prominentes aún continúan la discusión acerca de que el cargamento puede realizarse mediante vesículas de transporte entre las cisternas de Golgi en sentido anterógrado. Por lo tanto, el asunto aún no está zanjado.

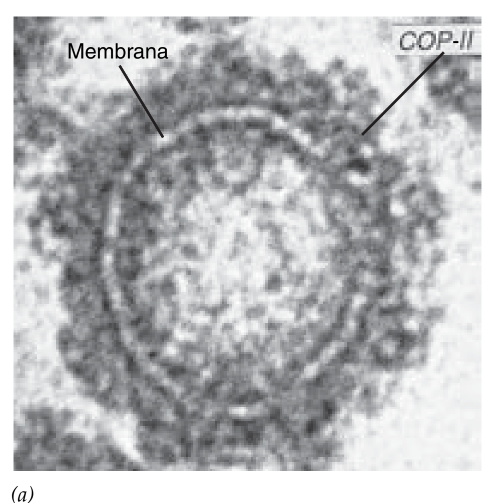
REVISIÓN ?

1. Describa los pasos que ocurren cuando una proteína soluble, como una enzima digestiva en una célula pancreática, se mueve del RER a la cisterna *cis* de Golgi, y desde la cisterna *cis* a la red *trans* de Golgi.
2. ¿Cuál es el papel del fosfato de dolicol en la síntesis de las glucoproteínas de membrana?, ¿cómo se determina la secuencia de los azúcares unidos con la proteína?
3. ¿Qué comparación puede establecerse entre el proceso de glucosilación en el aparato de Golgi y el del retículo endoplásmico rugoso?
4. ¿Cómo puede conciliarse el modelo de maduración de cisternas de la actividad en el aparato de Golgi con la presencia de vesículas de transporte en la región de este organelo?

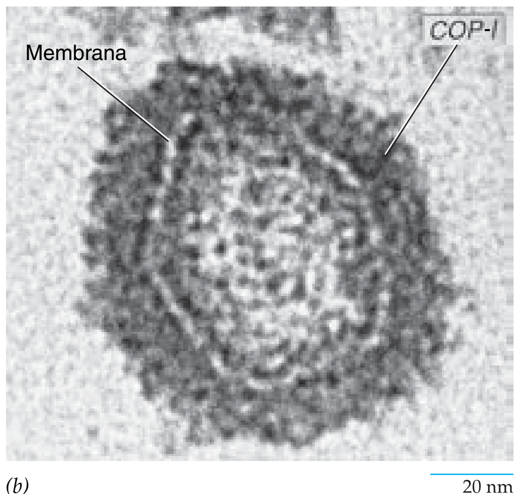
8.5 TIPOS DE TRANSPORTE EN VESÍCULAS Y SUS FUNCIONES

La vía biosintética de una célula eucariota consiste en una serie de distintos organelos limitados por membrana que participan en la síntesis, modificación y entrega de proteínas solubles y membranosas en su destino apropiado en la célula. Como se ilustra en la figura 8-2*a*, los materiales son transportados entre compartimientos por vesículas (u otros tipos de transportadores limitados por membrana) que se desprenden de membranas donantes y se fusionan con las membranas receptoras. Si se revisan micrografías electrónicas en busca de vesículas atrapadas en el acto de desprenderse, se encuentra que la mayoría de estas yemas membranosas están cubiertas en su superficie citosólica por una capa electrodensa "difusa". Un análisis más cuidadoso revela que la capa teñida de color oscuro consta de una cubierta proteínica formada por proteínas solubles que se ensamblan en la superficie citosólica de la membrana donante en sitios en que ocurre el desprendimiento de las vesículas. El ensamblaje es iniciado por la activación de una pequeña proteína G que es reclutada específicamente en ese sitio. Cada yema cubierta se desprende para formar una **vesícula cubierta**, como la que se muestra en la figura 8-24. Se pueden formar vesículas de tamaño y estructura similares en sistemas libres de células, como se ilustra en la figura 8-6. (El descubrimiento de las vesículas cubiertas se trata en la sección Vías experimentales al final del capítulo.)

Las cubiertas de proteína tienen por lo menos dos funciones distintas: a) actúan como dispositivo mecánico que hace que la membrana se curve y forme una vesícula desprendible y b) proporcionan un mecanismo para seleccionar los componentes que transporta la vesícula. Los componentes seleccionados incluyen: a) cargamento consistente en proteínas secretoras, lisosómicas y de membrana que deben transportarse y b) la estructura necesaria para dirigir y conectar la vesícula con la membrana receptora correcta (pág. 304). Como se explica más adelante, las cubiertas proteicas son capaces de hacer estas selecciones en virtud de su afinidad específica por las "colas" citosólicas de las proteínas integrales que residen en la membrana donante (véase fig. 8-25*b*).



(a)



(b)
20 nm

FIGURA 8-24 Vesículas cubiertas. Estas micrografías electrónicas muestran que la superficie externa (citosólica) de las membranas de estas vesículas posee una cubierta proteica distintiva. La primera micrografía (*a*) muestra una vesícula cubierta con COP-II, mientras que la segunda (*b*) muestra una vesícula cubierta de COP-I. (CORTESÍA DE RANDY SCHEKMAN Y LELIO ORCI.)

Se han identificado diferentes clases de vesículas cubiertas; se distinguen por las proteínas que conforman la cubierta, su apariencia al microscopio electrónico y su papel en el tránsito celular. Las tres vesículas cubiertas mejor estudiadas son las siguientes:

1. Las **vesículas cubiertas con COP-II** (fig. 8-24*a*) desplazan materiales del retículo endoplásmico "hacia adelante" al ERGIC y al aparato de Golgi. (Recuérdese que en la página 293 se mencionó que el ERGIC es el compartimiento intermedio situado entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi.) (COP es una sigla para las proteínas de cubierta, del inglés *coat proteins*.)
2. Las **vesículas cubiertas con COP-I** (fig. 8-24*b*) mueven materiales en sentido retrógrado: a) del ERGIC y pila de Golgi "hacia atrás" al ER y b) de las cisternas Golgi *trans* "de regreso" a las cisternas Golgi *cis* (véase fig. 8-25*a*).
3. Las **vesículas cubiertas con clatrina** movilizan materiales de la TGN a los endosomas, lisosomas y vacuolas vegetales. También mueven materiales de la membrana plasmática a los compartimientos citoplásmicos a lo largo de la vía endocítica. Asimismo, se han referido en el tránsito de los endosomas y los lisosomas.

En las secciones siguientes se considera cada tipo de vesícula cubierta.[5] La figura 8-25*a* presenta un resumen de los diversos pasos del transporte en la vía biosintética o secretora mediados por cada una de estas vesículas cubiertas.

[5]Aunque en la exposición se enfatiza en las moléculas de proteína de la cubierta y la vesícula, los fosfolípidos de la membrana de la vesícula también tienen un cometido relevante. Como se expone en el capítulo 15, es posible agregar grupos fosfato en diferentes posiciones del anillo de azúcar del fosfolípido fosfatidilinositol (PI), lo cual los convierte en fosfoinosítidos (véase fig. 15-23). Los anillos fosforilados de estos fosfoinosítidos residen en la superficie de la membrana, donde pueden ser reconocidos y enlazados por proteínas específicas. Diversos fosfoinosítidos se concentran en distintos compartimientos de la membrana, lo cual ayuda a dar a cada compartimiento una "identidad de superficie" única. Por ejemplo, la hoja interna de la membrana plasmática tiende a contener altas concentraciones de PI(4,5)P_2, que tienen una participación importante en el envío de proteínas, como la clatrina, a sitios de endocitosis (pág. 313). Es posible que una especie de lípido como PI(4,5)P_2 tenga una función reguladora dinámica porque se puede formar y destruir con rapidez por efecto de enzimas localizadas en sitios y momentos particulares dentro de la célula.

Vesículas cubiertas con COP-II: transporte de cargamento del retículo endoplásmico al aparato de Golgi

Las vesículas cubiertas con COP-II median la primera rama del traslado por la vía biosintética, del ER al ERGIC y la red de Golgi *cis* (fig. 8-25*a*, *b*). La cubierta COP-II contiene cinco proteínas que se identificaron por primera vez en células mutantes de levaduras que no podían realizar el transporte del ER al aparato de Golgi. Más tarde se encontraron homólogos de las proteínas de levaduras en las cubiertas de vesículas que se desprenden del ER en células de mamíferos. Los anticuerpos contra las proteínas de la cubierta COP-II bloquean el desprendimiento de las vesículas de las membranas del ER, pero no tienen efecto en el movimiento de cargamento en otras etapas en la vía secretora.

Se cree que las cubiertas de COP-II seleccionan y concentran ciertos componentes para el transporte en vesículas. Ciertas proteínas integrales de membrana del ER se capturan en forma selectiva porque contienen señales de "exportación del ER" como parte de su cola citosólica. Estas señales interactúan de manera específica con las proteínas COP-II de la cubierta de vesícula (fig. 8-25*b*). Las proteínas seleccionadas por las vesículas cubiertas con COP-II incluyen: a) enzimas que actúan en las etapas avanzadas de la vía biosintética, como las glucosiltransferasas del aparato de Golgi (indicadas como proteínas de membrana anaranjadas en la fig. 8-25*b*); b) proteínas de membrana participantes en la fijación y fusión de la vesícula con el compartimiento blanco, y c) proteínas de membrana que pueden unirse con cargamento soluble (como las proteínas secretoras, indicadas con las esferas rojas en la figura 8-25*b*). Las mutaciones en uno de estos receptores de cargamento se han vinculado con un trastorno hemorrágico hereditario. Las personas con esta anormalidad no secretan ciertos factores de coagulación que promueven la coagulación sanguínea.

Entre las proteínas de cubierta COP-II se encuentra una pequeña proteína G llamada Sar1, que es reclutada específicamente en la membrana del retículo endoplásmico. Como otras proteínas G, Sar1 tiene una función reguladora, en este caso en el inicio de la formación de la vesícula y la regulación del ensamblaje de la cubierta de la vesícula. Estas actividades se ilustran en la figura 8-26. En el paso 1 de la figura 8-26*a*, Sar1 es reclutada en la membrana del retículo endoplásmico en la forma unida a GDP y es inducida a intercambiar su GDP por

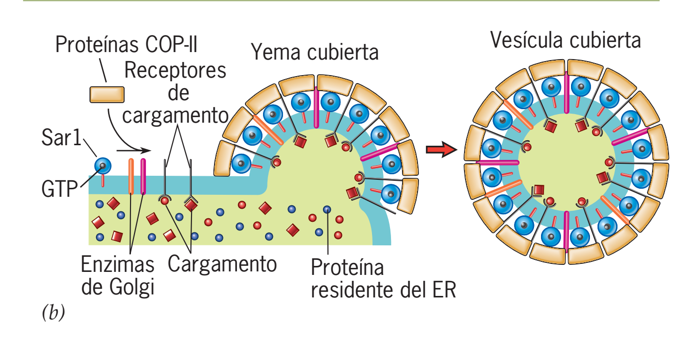
una molécula de GTP. Al unirse a GTP, Sar1 sufre un cambio de conformación que hace que la hélice α *N* terminal se inserte en la hoja citosólica de la bicapa del retículo endoplásmico (paso 2). Se ha demostrado que este suceso dobla la bicapa lipídica, lo cual constituye un paso importante en la conversión de una membrana aplanada en una vesícula esférica. Es probable que a la flexión de la membrana contribuya un cambio en el empaque de los lípidos que constituyen las dos hojas de la bicapa. En el paso 3, el complejo Sar1-GTP ha reclutado dos polipéptidos más de la cubierta COP-II, que se unen como un dímero "con forma de plátano". Debido a su curvatura, este dímero aporta presión adicional a la superficie de la membrana para ayudar aún más a darle su forma de yema redondeada. En la figura 8-26*b* se muestra una representación de una vesícula de 60 nm con esta parte de la cubierta COP-II unida a su superficie. En la figura 8-26*a*, paso 4, las subunidades restantes de COP-II se unen a la membrana para formar el andamiaje estructural de la cubierta proteínica. Finalmente, la yema se separa de la membrana del retículo endoplásmico en la forma de una vesícula cubierta de COP-II. Antes que la vesícula cubierta pueda fusionarse con una membrana blanco, la cubierta proteica debe desarticularse y sus componentes liberarse hacia el citosol. El desacoplamiento se inicia por la hidrólisis del GTP unido para producir una subunidad Sar1-GDP, que tiene menor afinidad por la membrana de la vesícula. La separación de Sar1-GDP de la membrana va seguida de la liberación de otras subunidades COP-II.

Vesículas cubiertas con COP-I: transporte de proteínas escapadas de regreso al retículo endoplásmico

Las vesículas cubiertas con COP-I se identificaron por primera vez en experimentos en los que las células se trataron con moléculas de estructura similar al GTP (análogos de GTP), pero a diferencia de éste, no pueden hidrolizarse. En estas condiciones,

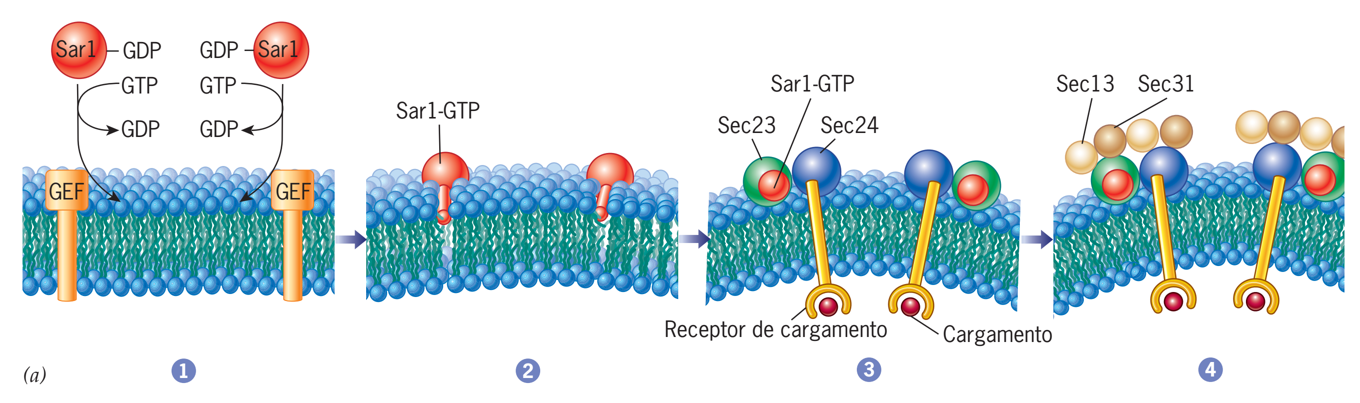
Gránulo secretor
Clatrina
Endosoma/ lisosoma
TGN
COP-I
Cisterna de Golgi
COP-I
Cisterna de Golgi
COP-I
CGN
VTC
ERGIC
COP-I
COP-II
Cargamento
COP-II
COP-I
Retículo endoplásmico rugoso

(a)



(b)

FIGURA 8-25 Propuesta del movimiento de materiales mediante el transporte vesicular entre los compartimientos membranosos de la vía biosintética/secretora. *a)* Se cree que los tres tipos diferentes de vesículas cubiertas indicadas en este dibujo tienen distintos papeles en el transporte. Las vesículas cubiertas con COP-II median el transporte del ER al ERGIC y al aparato de Golgi. Las vesículas cubiertas con COP-I regresan las proteínas del ERGIC y aparato de Golgi al ER. Las vesículas cubiertas con COP-I también trasladan las enzimas de Golgi entre las cisternas en sentido retrógrado. Las vesículas cubiertas con clatrina se encargan del transporte de la TGN a los endosomas y lisosomas. En esta representación no se muestra el transporte de materiales a lo largo de la vía endocítica. *b)* Ilustración del ensamble de una vesícula cubierta con COP-II. El ensamblaje comienza cuando Sar1 es enviada a la membrana del retículo endoplásmico y se activa por intercambio del GDP que lleva unido por GTP. Estos pasos se muestran en la figura 8-26. Las proteínas de cargamento de la luz del ER (esferas y rombos rojos) se unen con los extremos luminales de los receptores transmembranosos para cargamento. A continuación, estos receptores se concentran en la vesícula cubierta mediante la interacción de sus colas citosólicas con componentes de la cubierta COP-II. Las proteínas residentes del ER (p. ej., BiP) casi siempre se excluyen de las vesículas cubiertas (esferas azules). Las que llegan a incluirse en una vesícula cubierta se regresan al ER como se describe más adelante en el texto. Una de las proteínas de la cubierta COP-II, Sec24, puede encontrarse por lo menos en cuatro isoformas distintas. Es probable que las isoformas de esta proteína reconozcan y se unan a las proteínas de membrana con diferentes señales clasificadoras, lo que amplía la especificidad en tipos de materiales que pueden transportarse en las vesículas COP-II.



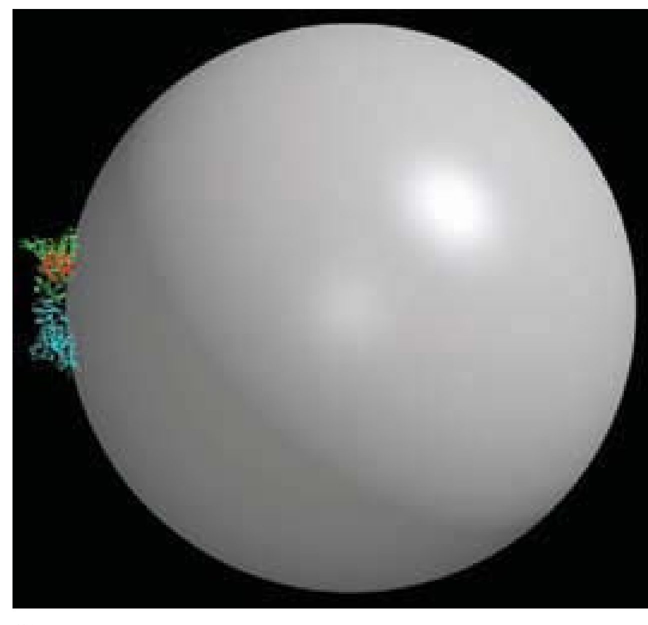


FIGURA 8-26 **Funciones propuestas de las proteínas cubiertas de COP-II en la generación de la curvatura de la membrana, el ensamblaje de la cubierta proteínica y la captura de cargamento.** *a*) En el paso 1, las moléculas de Sar1-GDP han sido enviadas a la membrana del retículo endoplásmico por una proteína llamada GEF (factor de intercambio de guanina) que cataliza el intercambio del GDP unido por GTP unido. En el paso 2, cada molécula de Sar1-GTP ha extendido una hélice α digitiforme a lo largo de la membrana dentro de la hoja citosólica. Este suceso induce la curvatura de la bicapa lipídica en ese sitio. En el paso 3, un dímero formado por dos polipéptidos COP-II (Sec23 y Sec24) ha sido reclutado por la molécula Sar1-GTP unida. Se piensa que el dímero Sec23-Sec24 induce un aumento de la curvatura de la membrana durante la formación de la vesícula. Tanto Sar1 como Sec23-Sec24 pueden contribuir a la curvatura de la membrana cuando se incuban con liposomas sintéticos in vitro. Dentro de la vesícula de COP-II en formación se acumulan receptores de cargamento transmembranosos, y sus colas citosólicas se unen al polipéptido Sec24 de la cubierta de COP-II. En el paso 4, los polipéptidos COP-II restantes (Sec13 y Sec31) se han unido al complejo para formar una capa estructural externa de la cubierta. *b*) Vista esquemática de un complejo Sec23-Sec24-Sar1 individual unido a la superficie de una "vesícula" de 60 nm. Esta imagen muestra los tamaños relativos de las proteínas COP-II individuales respecto al de la vesícula, y el modo en que la superficie interna del complejo proteínico se ajusta a la curvatura de la vesícula. (*B*, TOMADA DE LINCOLN C. BICKFORD, ELENA MOSSESSOVA Y JONATHAN GOLDBERG, CURR. OPIN. STRUCT. BIOL. 14:150, 2004; COPYRIGHT 2004, CON AUTORIZACIÓN DE ELSEVIER SCIENCE.)

las vesículas cubiertas con COP-I se acumularon dentro de la célula (fig. 8-27) y se pudieron aislar de las células homogeneizadas mediante centrifugación por gradiente de densidad (sección 18.6). Las vesículas cubiertas con COP-I se acumulan en presencia de un análogo de GTP no hidrolizable porque, como sus contrapartes COP-II, la cubierta posee una proteína de unión con GTP llamada ARF1, cuyo GTP unido debe hidrolizarse antes de desarticularse la cubierta. Las vesículas cubiertas con COP-I median el transporte retrógrado de proteínas, incluido el movimiento de: a) las enzimas residentes en el aparato de Golgi en dirección *trans* a *cis* (como se indica en la figura 8-23*d*, que muestra una molécula de manosidasa II marcada con oro en una vesícula COP-I) y b) enzimas residentes del ER del ERGIC y el complejo Golgi de regreso al ER (fig. 8-25*a*). Para comprender el papel de las vesículas cubiertas con COP-I en el transporte retrógrado hay que considerar un tema más general.

Conservación y recuperación de las proteínas residentes del retículo endoplásmico Si las vesículas se desprenden en forma continua de los compartimientos de membrana, ¿cómo es

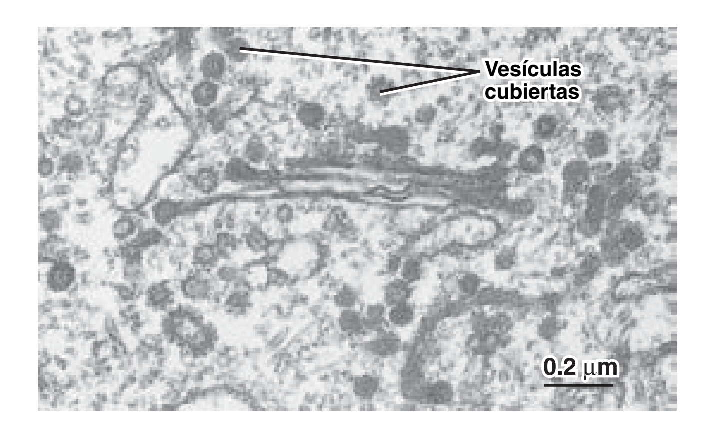


FIGURA 8-27 **Acumulación de vesículas cubiertas con COP-I.** Esta micrografía muestra el aparato de Golgi de una célula permeabilizada que se trató con un análogo de GTP no hidrolizable (GTPγS). Se reconocen muchas vesículas cubiertas con COP-I y yemas cubiertas. La cubierta COP-I contiene siete proteínas distintas, además de la proteína de unión con GTP ARF1. (TOMADA DE JAMES E. ROTHMAN Y LELIO ORCI, FASEB J 4:1467, 1990.)

que cada compartimiento conserva su composición única?, ¿qué determina, por ejemplo, si una proteína particular de la membrana del ER permanece en él o se dirige al aparato de Golgi? Los estudios sugieren que las proteínas se mantienen en un organelo por la combinación de dos mecanismos: a) *retención* de moléculas residentes que se excluyen de las vesículas de transporte y b) *recuperación* de las moléculas "fugitivas" para devolverlas al compartimiento en el que residen.

Las proteínas que habitualmente residen en el ER, sea en la luz o la membrana, contienen secuencias cortas de aminoácidos en su extremo C que sirven como *señales de recuperación*, lo que asegura su regreso al ER en caso que se trasladen por accidente hacia el ERGIC o aparato de Golgi. La recuperación de las proteínas del ER "que escaparon" de estos compartimientos se realiza mediante receptores específicos que capturan las moléculas y las regresan al ER en vesículas cubiertas con COP-I (fig. 8-25*a*, 8-28). Las proteínas solubles residentes de la luz del ER (como la isomerasa de disulfuro de proteínas y las chaperonas moleculares que facilitan el plegamiento) casi siempre tienen la señal de recuperación "lis-asp-glu-leu" (o KDEL en la nomenclatura de una sola letra). Como se muestra en la figura 8-28, estas proteínas se reconocen y regresan al ER por el *receptor KDEL*, una proteína integral de la membrana que se traslada entre los compartimientos Golgi *cis* y el ER. Si la secuencia KDEL se borra de una proteína del ER, las proteínas fugitivas no regresan al ER, sino que se trasladan al aparato de Golgi. Por el contrario, cuando se manipula una célula con ingeniería genética para que exprese una proteína lisosómica o secretora que contiene un extremo C KDEL adicional, esa proteína se regresa al ER en lugar de enviarse a su destino apropiado. Las proteínas de membrana residentes del ER, como el receptor SRP, también tienen una señal de recuperación en su extremo C (casi siempre KKXX, donde K es lisina y X es cualquier aminoácido) que se une con la cubierta COP-I, lo que facilita su regreso al ER. Cada compartimiento de membrana en la vía biosintética puede tener sus propias señales de recuperación únicas, lo que ayuda a explicar cómo cada compartimiento mantiene su complemento único de proteínas a pesar del movimiento constante de vesículas que entran y salen del compartimiento.

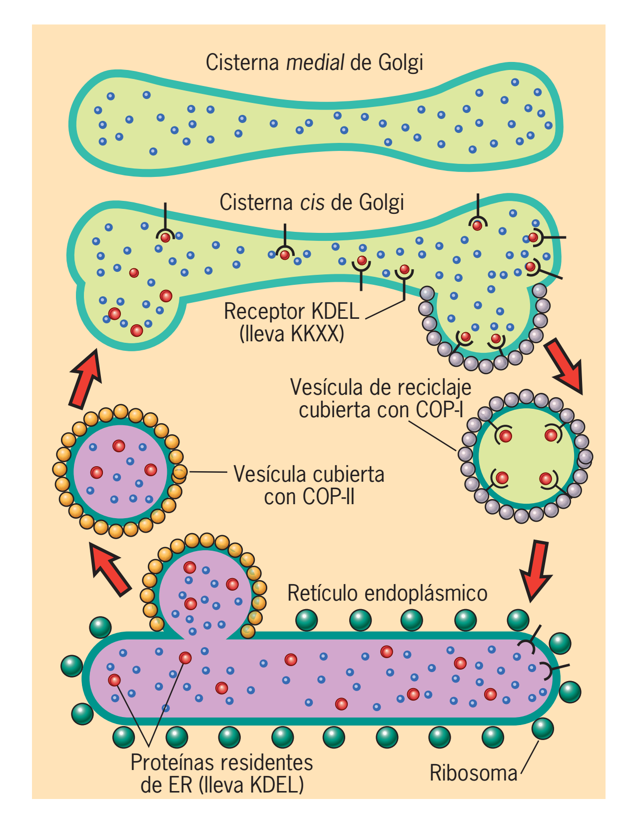


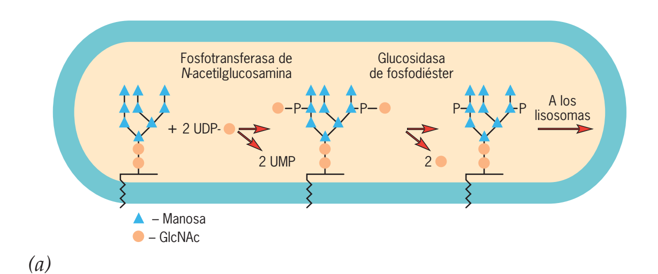
FIGURA 8-28 **Recuperación de proteínas del ER.** Las proteínas residentes del ER contienen secuencias de aminoácidos que permiten su recuperación del aparato de Golgi si se incorporan de manera accidental en una vesícula de transporte de Golgi. Las proteínas solubles del ER tienen la señal de recuperación KDEL, mientras que las proteínas de membrana del ER poseen la señal KKXX. La recuperación se realiza cuando las proteínas solubles del ER se unen con receptores para KDEL que se encuentran en la pared membranosa de los compartimientos *cis* de Golgi. A su vez, los receptores KDEL, que tienen la señal KKXX se unen con proteínas de la cubierta COP-I, lo que permite que todo el complejo se recicle de nueva cuenta al retículo endoplásmico.

Más allá del aparato de Golgi: ordenamiento de proteínas en el TGN

A pesar de la descripción de las vesículas de transporte, aún hay que examinar cómo una proteína particular sintetizada en el ER se dirige a un destino celular particular. Es importante que una célula sea capaz de distinguir entre las diversas proteínas que elabora. Por ejemplo, una célula pancreática tiene que separar las enzimas digestivas nuevas que se secretan a un conducto de las moléculas de adhesión celular recién sintetizadas que al final se instalan en la membrana plasmática y de las enzimas lisosómicas que se dirigen a los lisosomas. Esto se logra cuando la célula separa las proteínas destinadas a sitios diferentes en distintos portadores limitados por membranas. La red *trans* de Golgi (TGN), que es la última estación en el aparato de Golgi, funciona como una instancia clasificadora y dirige las proteínas hacia diversos destinos. La más conocida de las vías posteriores del aparato de Golgi es la que lleva enzimas lisosómicas.

Ordenamiento y transporte de enzimas lisosómicas Las proteínas lisosómicas se sintetizan en ribosomas unidos con la membrana en el ER y se transportan al aparato de Golgi junto con otros tipos de proteínas. Una vez en las cisternas de Golgi, ciertas enzimas reconocen a las enzimas lisosómicas solubles y catalizan la adición de un grupo fosfato en dos pasos a ciertos azúcares manosa de las cadenas de carbohidrato con enlaces *N* (fig. 8-29*a*). Por lo tanto, a diferencia de otras glucoproteínas separadas en la TGN, las enzimas lisosómicas tienen residuos de manosa fosforilados que actúan como señales de reconocimiento. Este mecanismo de separación de proteínas se descubrió mediante estudios en células de seres humanos que carecían de las enzimas participantes en la adición de fosfato (descrito en Perspectiva humana, pág. 309). Los *receptores para manosa 6-fosfato* (*MPR*) reconocen y capturan a las enzimas lisosómicas que llevan la señal manosa 6-fosfato; los receptores son proteínas integrales de la membrana que cruzan las membranas de la TGN (fig. 8-29*b*).

Las enzimas lisosómicas se transportan desde la TGN en vesículas cubiertas con clatrina (el tercer y último tipo de



(a)

Endocitosis
Lisosoma
Endosoma
6
Disociación de enzima lisosómica del receptor para manosa 6-fosfato
4
Reciclado del receptor de manosa 6-fosfato
3
5
Receptor para manosa 6-fosfato
2
Red *trans* de Golgi
Cisterna *cis* de Golgi
1
Fosfoliración de enzima lisosómica
Enzima lisosómica
Retículo endoplásmico rugoso

(b)

FIGURA 8-29 Dirección de las enzimas lisosómicas a los lisosomas. *a)* Hay una enzima en las cisternas *cis* que reconoce a las enzimas lisosómicas y transfiere una *N*-acetilglucosamina fosforilada de un donante azúcar nucleótido a uno o más residuos de manosa de oligosacáridos con enlace *N*. Después, la fracción glucosamina se retira en un segundo paso por acción de una segunda enzima, lo que deja residuos de manosa 6-fosfato como parte de la cadena de oligosacárido. *b)* Esquema que muestra las vías que sigue una enzima lisosómica (negro) desde el sitio de síntesis en el ER hasta su entrega al lisosoma. Los residuos de manosa de la enzima lisosómica se fosforilan en las cisternas de Golgi (paso 1) y luego se incorporan en forma selectiva en la vesícula cubierta con clatrina en la TGN (paso 2). Se cree que los receptores para manosa 6-fosfato tienen una doble función: interactúan en forma específica con las enzimas lisosómicas en el lado luminal de la vesícula y hacen de manera específica con los adaptadores en la superficie citosólica de la vesícula (se muestra en la figura 8-30). Los receptores para manosa 6-fosfato se separan de las enzimas (paso 4) y regresan al aparato de Golgi (paso 5). Las enzimas lisosómicas quedan a disposición de un endosoma y al final de un lisosoma. Los receptores para manosa 6-fosfato también están presentes en la membrana plasmática, donde pueden capturar enzimas lisosómicas que se secretan hacia el espacio extracelular y regresan las enzimas a una vía que las dirige a un lisosoma (paso 6).

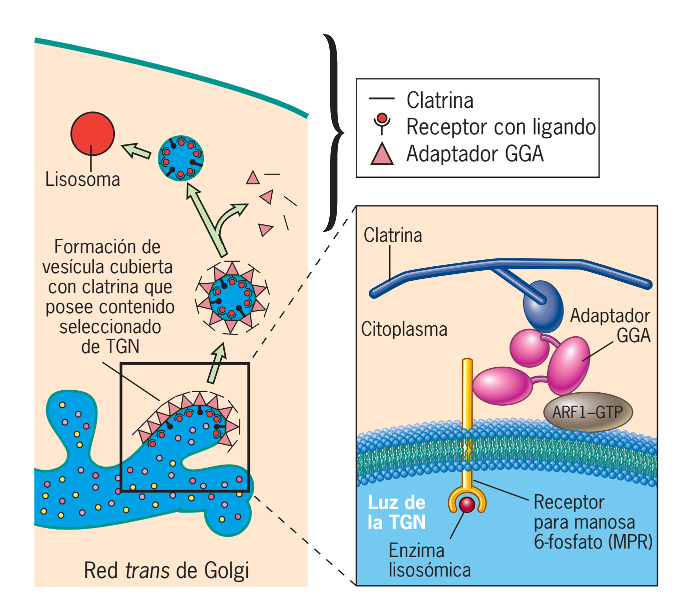


FIGURA 8-30 Formación de vesículas cubiertas con clatrina en la red *trans* de Golgi. Las vesículas cubiertas con clatrina que se desprenden de la TGN contienen GGA, una proteína adaptadora consistente en varios dominios distintos. Uno de los dominios de GGA se une con los dominios citosólicos de las proteínas de membrana, incluidas las que al final se instalan en la membrana limitante del lisosoma y también el MPR que transporta enzimas lisosómicas. Otros dominios de GGA se unen con ARF1 y con la red citosólica circundante de moléculas de clatrina.

vesículas cubiertas que deben describirse). La estructura de las vesículas cubiertas con clatrina se aborda en la página 313 junto con la endocitosis, un proceso que se conoce mejor que el desprendimiento de vesículas en la TGN. Por ahora es suficiente con señalar que las cubiertas de estas vesículas contienen: a) una celosía externa parecida a un panal formada por la proteína clatrina, la cual constituye un soporte estructural, y b) una capa interna formada por adaptadores de proteína que cubre la superficie de la membrana de la vesícula y que está dirigida hacia el citosol (fig. 8-30). El término "adaptador" alude a una molécula que vincula dos tipos diferentes de materiales. Las enzimas lisosómicas están flanqueadas desde la TGN por una familia recién descubierta de proteínas adaptadoras llamadas **GGA**.

Como se indica en el recuadro de la figura 8-30, una molécula de GGA tiene varios dominios, cada uno capaz de sujetar una proteína diferente que participa en la formación de vesículas. Los extremos exteriores de los adaptadores GGA se unen con las moléculas de clatrina, con lo que fijan la configuración de clatrina a la superficie de la vesícula. En la superficie interna, los adaptadores GGA se unen con una señal clasificadora en las colas citosólicas de los receptores para manosa 6-fosfato. A su vez, estos MPR se unen con las enzimas lisosómicas solubles dentro de la luz de la vesícula (fig. 8-30, recuadro). Como resultado de estas interacciones con los adaptadores GGA, los MPR de la membrana de la red *trans* de Golgi y las enzimas lisosómicas dentro de la luz de la TGN se concentran en las vesículas cubiertas con clatrina. Como sucede con la formación de vesículas con COP-I y COP-II, la producción de vesículas cubiertas con clatrina comienza con el reclutamiento en la membrana de una pequeña proteína para unión con GTP, en este caso ARF1, que establece las condiciones para la unión de las otras proteínas de la cubierta. Una vez que la vesícula se desprende de la TGN, la cubierta de clatrina se pierde y la vesícula descubierta avanza a su destino, el cual puede ser un endosoma temprano, endosoma tardío o vacuola en una célula vegetal. Antes de llegar a alguno de estos organelos, los MPR se separan de las enzimas lisosómicas y regresan a la TGN (fig. 8-29*b*) para iniciar otra ronda de transporte de enzima lisosómica.

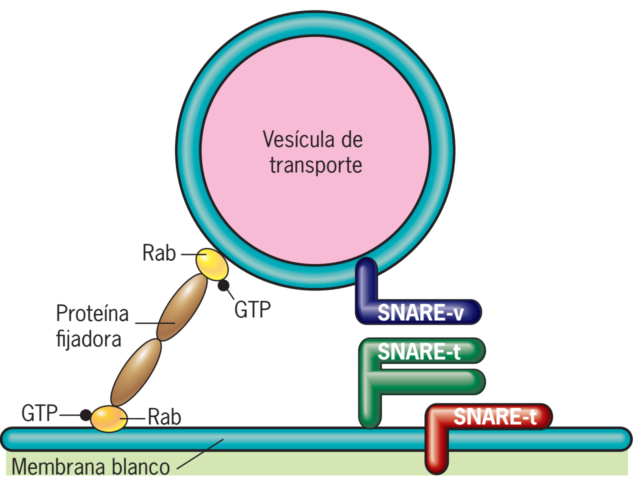
Separación y transporte de proteínas no lisosómicas Las proteínas lisosómicas no son los únicos materiales que abandonan la TGN. Como se indica en la figura 8-2, las proteínas de membrana destinadas a la membrana plasmática y los materiales secretores destinados a la exportación fuera de la célula también se transportan desde la TGN, pero se sabe poco de los mecanismos implicados. De acuerdo con un modelo, los portadores membranosos se producen cuando la TGN se fragmenta en vesículas y túbulos de diversos tamaños. Este concepto se adapta al modelo de maduración de cisternas, que propone que las cisternas del aparato de Golgi se mueven en forma continua en dirección a la TGN, donde tendrían que dispersarse para permitir la maduración continua de la pila del Golgi. Se cree que las proteínas que se descargan a la célula mediante un proceso de secreción regulada, como el caso de las enzimas digestivas y las hormonas, forman agregados selectivos que al final se retienen en gránulos secretores grandes y muy concentrados. Parece que estos agregados quedan atrapados cuando los gránulos secretores se desprenden de los bordes de las cisternas *trans* de Golgi y la TGN. Después, los gránulos secretores se almacenan en el citoplasma hasta que su contenido se libera después que la célula recibe la estimulación de una hormona o impulso nervioso.

La entrega dirigida de las proteínas integrales a la membrana plasmática parece basarse sobre todo en las señales de separación en los dominios citoplásmicos de las proteínas de membrana. Hay muchas investigaciones que se han enfocado en células polarizadas, como las que se muestran en la figura 8-11. En estas células, las proteínas de membrana destinadas a residir en la porción apical de la membrana plasmática contienen diferentes señales de separación respecto de las de proteínas destinadas a la porción lateral o basal. Es posible que las proteínas plasmáticas de células no polarizadas, como los fibroblastos y los leucocitos, no requieran señales de separación especiales. Tal vez estas proteínas tan sólo se trasladen de la TGN a la superficie celular en vesículas de la vía secretora constitutiva (fig. 8-2*b*).

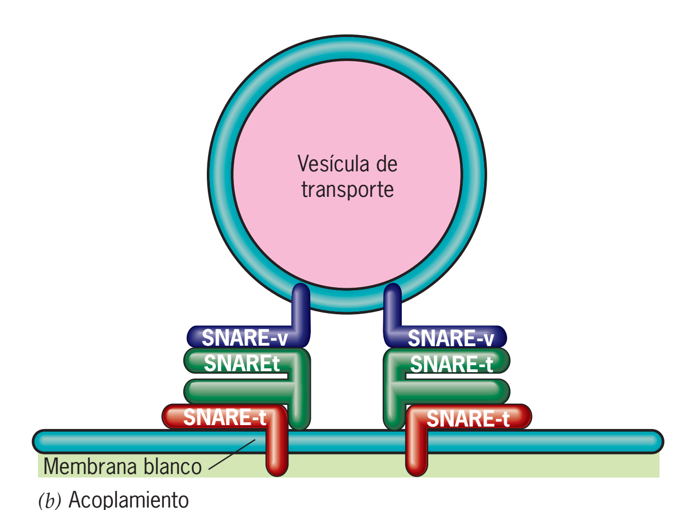
Direccionamiento de las vesículas a un compartimiento particular

La fusión de las vesículas requiere interacciones específicas entre membranas diferentes. Por ejemplo, las vesículas del ER se fusionan con el ERGIC o red *cis* de Golgi y no con una cisterna *trans*. La fusión selectiva es uno de los factores que asegura un flujo directo por los compartimientos membranosos de la célula. A pesar de un gran esfuerzo de investigación, aún no se comprenden del todo los mecanismos por medio de los cuales las células dirigen a las vesículas a compartimientos especiales. Se asume que una vesícula contiene proteínas específicas relacionadas con su membrana que regulan los movimientos y el potencial de fusión de esa vesícula. Para comprender la naturaleza de estas proteínas, se consideran los pasos que ocurren entre el desprendimiento de la vesícula y la fusión de la vesícula.

1. ***Movimiento de la vesícula hacia el compartimiento blanco específico.*** En muchos casos, las vesículas membranosas deben viajar distancias considerables en el citoplasma antes de llegar a su objetivo final. Estos tipos de movimiento están mediados sobre todo por microtúbulos, que actúan como las vías de un tren que lleva contenedores con cargamento a lo largo de un trayecto definido hacia un destino predeterminado. Por ejemplo, los portadores membranosos que se ven en la figura 8-19 se mueven del ERGIC al aparato de Golgi mediante microtúbulos.
2. ***Fijación de las vesículas al compartimiento blanco.*** Los estudios microscópicos indican que las vesículas con frecuencia se "fijan" a un supuesto compartimiento blanco, como una cisterna de Golgi, mediante proteínas fibrosas extendidas (fig. 8-31*a*). Se ha postulado la hipótesis de que la fijación es una etapa temprana del proceso de fusión vesicular que requiere cierta especificidad entre la vesícula y el compartimiento blanco. Gran parte de esta especificidad puede conferirla una familia de pequeñas proteínas de unión con GTP llamadas **Rab**, que se relacionan con las membranas mediante una fijación lipídica. Con más de 60 genes Rab diferentes identificados en los seres humanos, estas proteínas constituyen el grupo más diverso de proteínas participantes en el tránsito de membrana. Más importante es que distintas proteínas Rab se vinculan con diferentes compartimientos de membrana. Esta localización preferencial da a cada compartimiento una identidad de superficie única, necesaria para reclutar las proteínas implicadas en la especificidad de direccionamiento. Se piensa que en su estado unido a GTP, las Rab congregan proteínas citosólicas de fijación específicas en superficies específicas de la membrana (fig. 8-31*a*). Como se muestra en la figura 9-52*b*, las Rab también participan en el reclutamiento de las proteínas motoras que transportan vesículas membranosas a través del citoplasma.
3. ***Acoplamiento de las vesículas al compartimiento blanco.*** En algún momento durante el proceso que conduce a la fusión vesicular, las membranas de la vesícula y el compartimiento blanco entran en contacto estrecho como resultado de la interacción entre las regiones citosólicas de las proteínas



(a) Fijación

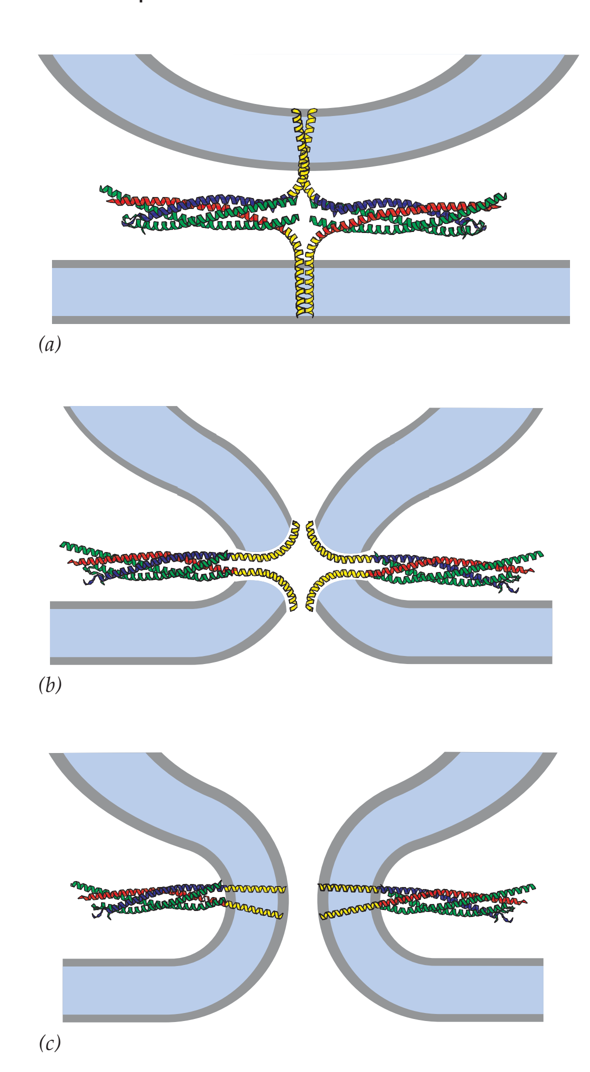


(b) Acoplamiento

FIGURA 8-31 Pasos propuestos en el direccionamiento de vesículas de transporte a las membranas blanco. *a)* Según este modelo, en el reclutamiento de una o más proteínas fijadoras que median el contacto entre las dos membranas, participan proteínas Rab presentes en la vesícula y en la membrana blanco. *b)* Durante la etapa de acoplamiento que lleva a la fusión de las membranas, una SNARE-v presente en la membrana de la vesícula interactúa con las SNARE-t situados en la membrana blanco para formar un haz helicoidal α de cuatro cadenas que pone las dos membranas en contacto estrecho (véase la siguiente figura). En los casos que se describen en el texto, SNAP-25, uno de los SNARE-t, es una proteína de membrana periférica y no tiene un dominio transmembranoso. SNAP-25 contribuye con dos hélices al haz de cuatro hélices de SNARE.

integrales de las dos membranas. Las proteínas clave que participan en estas interacciones se conocen como **SNARE** y constituyen una familia de más de 35 proteínas de membrana cuyos miembros se localizan en compartimientos subcelulares específicos. Aunque las proteínas SNARE tienen estructuras y tamaños muy diversos, todas poseen un segmento en su dominio citosólico llamado *motivo SNARE* que consiste en 60 a 70 aminoácidos capaces de formar un complejo con otro motivo SNARE. Las SNARE pueden dividirse en dos categorías, **SNARE-v**, que se incorporan en las membranas de vesículas de transporte durante el desprendimiento, y **SNARE-t**, que se localizan en las membranas de los compartimientos blanco (fig. 8-31*b*). Las SNARE mejor estudiadas son las que median el acoplamiento de vesículas sinápticas con la membrana presináptica durante la liberación regulada de neurotransmisores (pág. 168). En este caso, la membrana citoplásmica de la célula nerviosa contiene dos SNARE-t, sintaxina y SNAP-25, en tanto que la membrana de la vesícula sináptica contiene una sola SNARE-v, la sinaptobrevina. Cuando la vesícula sináptica y la membrana presináptica se aproximan una a la otra, los motivos SNARE de las moléculas SNARE-t y v de las membranas próximas interactúan para formar haces de cuatro hebras como se muestra en la figura 8-32*a*. Cada haz consiste en cuatro hélices alfa, dos donadas por SNAP-25 y una por la sintaxina y la sinaptobrevina, respectivamente. Juntas, estas hélices alfa paralelas forman un rizo entretejido ajustado que tira de las dos bicapas de lípidos y las aproxima bastante (fig. 8-31*b* y 8-32*a*). La formación de haces similares helicoidales de cuatro cadenas tiene lugar entre otras proteínas SNARE en otros sitios de la célula, en dondequiera que las membranas estén destinadas a fusionarse. Es interesante señalar que las proteínas SNARE de la vesícula sináptica y la membrana presináptica son los blancos de dos de las toxinas bacterianas más potentes: las causantes del botulismo y el tétanos. Estas toxinas letales actúan como proteasas cuyo único sustrato conocido son las SNARE. La escisión de las SNARE neuronales por las toxinas bloquea la liberación de neurotransmisores, lo que causa parálisis.

4. ***Fusión entre las membranas de la vesícula y el blanco.*** Cuando las vesículas artificiales de lípidos (liposomas) con SNARE-t purificada se mezclan con liposomas que contienen una SNARE-v purificada, los dos tipos de vesículas se fusionan entre sí, pero no las vesículas del mismo tipo. Este hallazgo indica que las interacciones entre las proteínas SNARE-t y v son capaces de unir dos bicapas de lípidos con la fuerza suficiente para hacer que se fusionen (fig. 8-32*b*, *c*). Sin embargo, hay mucha evidencia que sugiere que aunque la interacción entre las proteínas SNARE-v y t es necesaria para la fusión de las membranas, no es suficiente por sí misma para inducir la fusión *dentro de una célula*. De acuerdo con una hipótesis sobre la secreción regulada de moléculas de neurotransmisor, el haz con cuatro cadenas de SNARE permanece cerrado en una conformación inactiva. Las vesículas que están en esta etapa permanecen acopladas con la membrana y listas para descargar su contenido en forma casi instantánea una vez que reciban una señal de activación en la forma de un incremento de la concentración de Ca^{2+} (como se explica más adelante). Sin importar cuál sea la forma en que se regule, una vez que se fusionan las bicapas de lípidos de las dos membranas, las SNARE que sobresalían antes de membranas separadas residen en la misma membrana (fig. 8-32*c*). La disociación del complejo SNARE de cuatro cadenas se logra con una proteína citosólica con forma de rosquilla llamada NSF que se une con el haz SNARE y, usando energía procedente de la hidrólisis de ATP (trifosfato de adenosina), lo tuerce para separarlo.



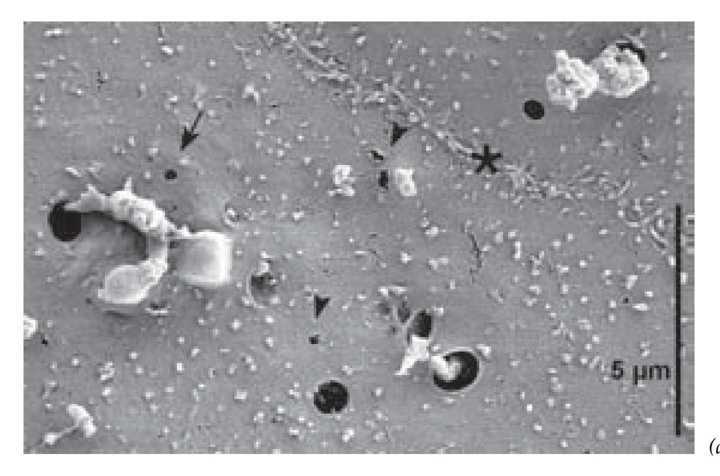


FIGURA 8-32 Un modelo de interacciones entre SNARE-v y SNARE-t que conducen a la fusión de membrana y exocitosis. *a)* La vesícula sináptica se acopló con la membrana plasmática mediante la formación de paquetes de cuatro cadenas que incluyen hélices alfa donadas por la sintaxina (rojo), sinaptobrevina (azul) y SNAP-25 (verde). SNAP-25 contribuye con dos hélices y carece de un dominio transmembranoso (amarillo). *b)* Estado de transición propuesto en la fusión de las dos membranas. Se muestra una pequeña cavidad llena con agua en el centro del haz transmembranoso de hélices. *c)* Las hélices transmembranosas que antes estaban en las dos membranas separadas ahora se hallan en la misma bicapa y se abrió un poro de fusión entre la vesícula y la membrana blanco. En este momento ya puede descargarse el contenido de neurotransmisor de la vesícula por exocitosis. *d)* Micrografía electrónica de barrido de la superficie extracelular de un par de células alveolares (pulmonares) cultivadas y estimuladas para descargar proteínas que se habían almacenado en gránulos secretores. El material se expulsa de la célula a través de aberturas lisas circulares que se presupone son poros de fusión dilatados. La flecha muestra un poro de fusión que no se dilató, fácil de distinguir de las "lágrimas" artificiales (punta de flecha) que se forman durante la preparación del espécimen. (*A-C*, TOMADA DE PEHR A. B. HARBURY, STRUCTURE 6:1490, 1998; *D*, TOMADA DE THOMAS HALLER, ET AL., J CELL BIOL 155:286, 2001. CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

Ahora que se describieron los fenómenos que ocurren durante la fusión de una vesícula con una membrana blanco es posible regresar a la pregunta, ¿cómo se determina la especificidad de esta interacción? De acuerdo con el consenso actual, la capacidad de una vesícula y membrana blanco particulares para fusionarse depende de la combinación específica de proteínas que interactúan, incluidas proteínas de fijación, proteínas Rab y SNARE que pueden ensamblarse en ese sitio de la célula. Consideradas en conjunto, estas múltiples interacciones entre varios tipos de proteínas proporcionan una gran especificidad, lo que asegura que cada compartimiento de membrana pueda reconocerse en forma selectiva.

Exocitosis La fusión de una vesícula secretora o gránulo secretor con la membrana plasmática y la descarga subsiguiente de su contenido se llama **exocitosis**. Es probable que la exocitosis ocurra en forma continua en la mayoría de las células, conforme se envían proteínas y otros materiales a la membrana plasmática y al espacio extracelular. Sin embargo, los ejemplos mejor estudiados de la exocitosis son los que ocurren durante la secreción regulada, sobre todo la liberación de neurotransmisores a la hendidura sináptica. En estos casos, la fusión de la membrana produce una abertura a través de la cual se libera el contenido de la vesícula o gránulo hacia el espacio extracelular. En la página 169 se indicó que la llegada de un impulso nervioso al botón terminal de una neurona induce un aumento de la entrada de Ca^{2+} con la descarga consecuente de moléculas de neurotransmisor por exocitosis. En este caso, la fusión está regulada por una proteína de unión con calcio (sinaptotagmina) presente en la membrana de la vesícula sináptica. En otros tipos de células, la exocitosis casi siempre se inicia por la liberación de Ca^{2+} de las reservas citoplásmicas. Se cree que el contacto entre la vesícula y las membranas plasmáticas conduce a la formación de un pequeño "poro de fusión" recubierto con proteína (fig. 8-32*c*). Algunos poros de fusión tan sólo se cierran de nuevo, pero en la mayor parte de los casos el poro se dilata con rapidez para formar una abertura para que se descargue el contenido de la vesícula (fig. 8-32*d*). Al margen del mecanismo, cuando una vesícula citoplásmica se fusiona con la membrana plasmática, la superficie luminal de la membrana de la vesícula se vuelve parte de la superficie externa de la membrana plasmática, mientras que la superficie citosólica de la membrana de la vesícula se torna parte de la cara interna (citosólica) de la membrana plasmática (fig. 8-14).

REVISIÓN ?

1. ¿Qué determina la especificidad de la interacción entre la vesícula de transporte y el compartimiento de membrana con el cual se fusiona?, ¿en qué forma participan las proteínas SNARE en el proceso de fusión de membrana?
2. Describa los pasos que aseguran que una enzima lisosómica se dirija a un lisosoma y no a una vesícula secretora. ¿Cuál es el papel de las proteínas GGA?
3. Contraste las funciones de las vesículas cubiertas con COP-I y COP-II en el tránsito de proteínas.
4. ¿Cómo aseguran las señales de recuperación que las proteínas se mantengan como residentes de un compartimiento de membrana particular?

8.6 LISOSOMAS

Los lisosomas son los organelos digestivos de una célula animal. Un lisosoma típico contiene cerca de 50 enzimas hidrofílicas diferentes (cuadro 8-1) que se producen en el retículo endoplásmico rugoso y se dirigen a estos organelos. Consideradas en conjunto, las enzimas lisosómicas pueden hidrolizar todo tipo de macromoléculas biológicas. Las enzimas de un lisosoma comparten una propiedad importante: todas alcanzan su actividad óptima en un pH ácido, por lo que son **hidrolasas ácidas**. El pH óptimo de estas enzimas se sitúa por debajo del pH del compartimiento lisosómico, que se aproxima a 4.6. La elevada concentración interna de protones se mantiene mediante una bomba de protones (una ATP-asa de H^+) presente en la membrana que limita al organelo. Las membranas lisosómicas contienen diversas proteínas integrales muy glucosiladas cuyas cadenas de carbohidratos se cree que forman un recubrimiento protector que protege a la membrana contra el ataque de las enzimas que encierra.

Aunque los lisosomas tienen una colección predecible de enzimas, su apariencia en las micrografías electrónicas no es distintiva ni uniforme. Su tamaño es variable, desde estructuras relativamente grandes (más de 1 μm de diámetro) hasta vesículas muy pequeñas (25 a 50 nm de diámetro). La figura 8-33 muestra una pequeña porción de una célula de Kupffer, una célula fagocítica del hígado que atrapa eritrocitos viejos. Los lisosomas de una célula de Kupffer tienen una forma irregular y densidad electrónica variable, lo que ilustra cuán difícil es identificar estos organelos sólo con base en su morfología.

La presencia dentro de una célula de lo que es, en esencia, una bolsa de enzimas destructivas sugiere varias funciones posibles. El papel mejor estudiado de los lisosomas es la degradación de materiales que llegan a la célula desde el ambiente extracelular. Muchos organismos unicelulares ingieren partículas de alimento que luego degradan por medios enzimáticos en un lisosoma. Los nutrimentos obtenidos pasan por la membrana lisosómica hacia el citosol. En los mamíferos, las células fagocíticas como los macrófagos y los neutrófilos funcionan como eliminadores que ingieren los detritos y microorganismos que pudieran ser peligrosos (pág. 274). Las bacterias ingeridas casi

Cuadro 8-1 Una muestra de enzimas lisosómicas

Enzima	Sustrato
Fosfatasas	
Fosfatasa ácida	Monoésteres de fosfato
Fosfodiesterasa ácida	Diésteres de fosfato
Nucleasas	
Ribonucleasa ácida	RNA
Desoxirribonucleasa ácida	DNA
Proteasas	
Catepsina	Proteínas
Colagenasa	Colágena
Enzimas que hidrolizan glucosaminoglucanos	
Sulfatasa de iduronato	Sulfato de dermatán
Galactosidasa β	Sulfato de queratán
Sulfatasa *N* de heparán	Sulfato de heparán
N-acetilglucosaminidasa α	Sulfato de heparán
Polisacaridasas y oligosacaridasas	
Glucosidasa α	Glucógeno
Fucosidasa	Fucosiloligosacáridos
Manosidasa α	Manosiloligosacáridos
Sialidasa	Sialiloligosacáridos
Enzimas que hidrolizan esfingolípidos	
Ceramidasa	Ceramida
Glucocerebrosidasa	Glucosilceramida
Hexosaminidasa β	Gangliósido G_{M2}
Arilsulfatasa A	Galactosilsulfatida
Enzimas que hidrolizan lípidos	
Lipasa ácida	Triacilgliceroles
Fosfolipasa	Fosfolípidos

siempre se desactivan por el pH bajo del lisosoma y luego se someten a la digestión enzimática. Como se explica en el capítulo 17, los péptidos obtenidos en este proceso digestivo se "pegan" en la superficie celular, donde alertan al sistema inmunológico sobre la presencia de un agente extraño.

Los lisosomas también tienen un papel clave en la **rotación** de organelos, esto es, la destrucción regulada de los propios organelos de la célula para su reposición. Durante este proceso, denominado **autofagia**, un organelo, como la mitocondria mostrada en la figura 8-34, es rodeado por una membrana doble derivada de una cisterna del ER. Después, la membrana externa se fusiona con un lisosoma para producir un *autofagolisosoma*, en el cual el organelo encerrado se degrada y los productos de degradación se hacen disponibles para la célula. Se calcula que una mitocondria se somete a la autofagia cada 10 minutos en una célula hepática de mamífero. Si la célula carece de

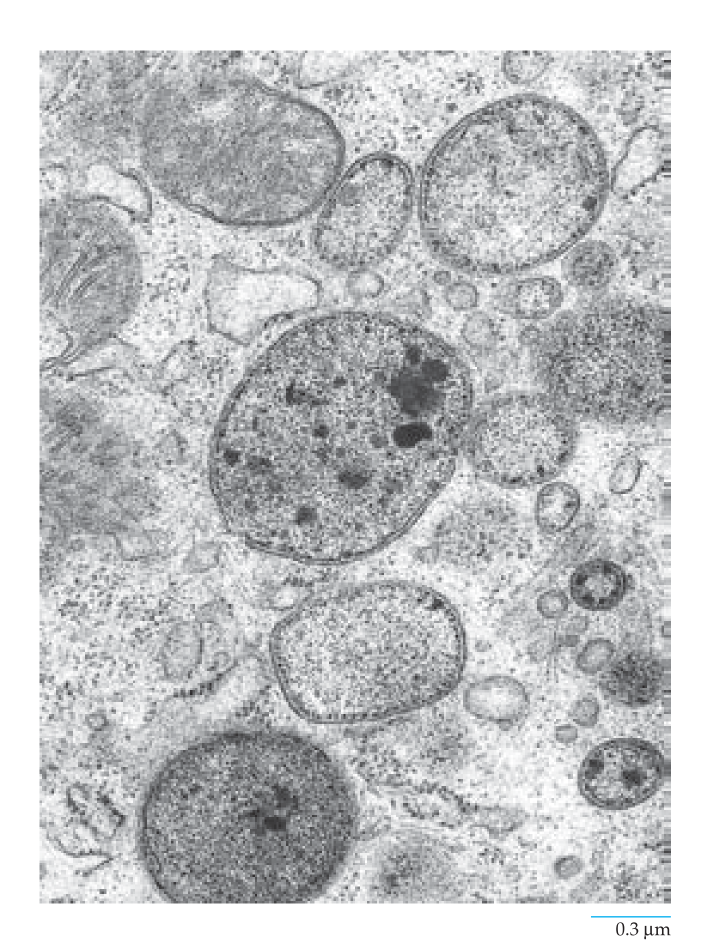


FIGURA 8-33 **Lisosomas.** Porción de una célula fagocítica de Kupffer de hígado que muestra por lo menos 10 lisosomas de tamaños muy variables. (Tomada de Hans Glaumann et al., J Cell Biol 67:887, 1975. Con autorización de los derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

FIGURA 8-34 **Autofagia.** Micrografía electrónica de una mitocondria y peroxisoma encerrados en una envoltura de membrana doble derivada del ER. Esta vacuola autofágica puede fusionarse con un lisosoma y su contenido digerirse. (Tomada de Don Fawcett y Daniel Friend/Photo Researchers.)

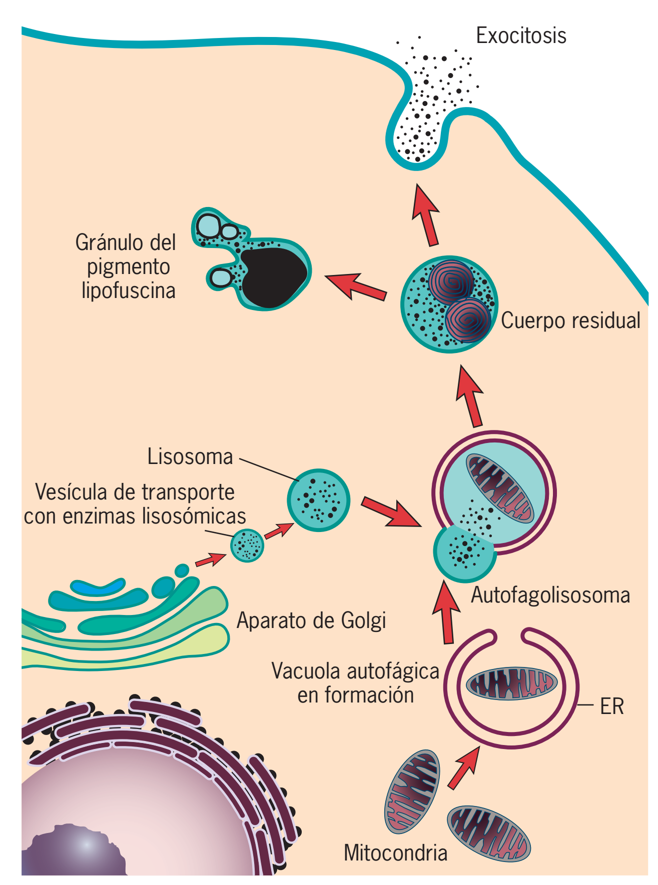


FIGURA 8-35 **Resumen de la vía autofágica.** Los pasos se describen en el texto.

nutrimentos, se observa un aumento notorio de la autofagia. En estas condiciones, la célula adquiere la energía para mantener su vida mediante el canibalismo de sus propios organelos. En años recientes se ha demostrado que la autofagia también ayuda a proteger al organismo contra amenazas intracelulares que van desde agregados proteínicos anormales hasta bacterias invasoras. Incluso puede servir como una vía que conduce a la muerte programada de células malignas.

El papel de los lisosomas en la autofagia se resume en la figura 8-35. Una vez que se completa el proceso digestivo en el autofagolisosoma, el organelo se conoce como *cuerpo residual*. Según sea el tipo celular, el contenido del cuerpo residual puede eliminarse de la célula mediante exocitosis o conservarse dentro del citoplasma por tiempo indefinido como un *gránulo de lipofuscina*. La cantidad de gránulos de lipofuscina se incrementa a medida que el individuo envejece; la acumulación es muy evidente en las células de vida prolongada, como las neuronas, en las que estos gránulos se consideran una característica principal del proceso de envejecimiento. El papel de los lisosomas en diversas enfermedades se describe en la sección Perspectiva humana.

REVISIÓN ?

1. Describa tres funciones distintas de los lisosomas.
2. Describa los fenómenos que tienen lugar durante la destrucción autofágica de una mitocondria.

PERSPECTIVA HUMANA

Trastornos secundarios a defectos de la función lisosómica

El conocimiento actual de los mecanismos por los cuales las proteínas se dirigen a organelos particulares comenzó con el descubrimiento de que los residuos de manosa 6-fosfato de las enzimas lisosómicas actúan como un "domicilio" para entregar estas proteínas a los lisosomas. El descubrimiento del domicilio de los lisosomas se efectuó en estudios de pacientes con una rara enfermedad hereditaria y letal conocida como *enfermedad de células I.* En estos sujetos, muchas células contienen lisosomas llenos con material no degradado. Los materiales se acumulan en los lisosomas por la ausencia de enzimas hidrolíticas. Cuando se estudiaron los fibroblastos de estas personas en cultivo, se encontró que las enzimas lisosómicas se sintetizan en cantidades normales, pero se secretan al medio y no se destinan a los lisosomas. El análisis minucioso reveló que las enzimas secretadas carecían de los residuos de fosfato de manosa que se observan en las enzimas correspondientes de células de individuos normales. En poco tiempo el defecto de célula I se rastreó hasta la deficiencia de una enzima (fosfotransferasa de *N*-acetilglucosamina) necesaria para la fosforilación de la manosa (véase fig. 8-29*a*).

En 1965, H. G. Hers, de la *Universidad de Lovaina* en Bélgica, ofreció una explicación del modo en que la ausencia de una enzima lisosómica que parecía sin importancia, la glucosidasa alfa, podía conducir al desarrollo de un trastorno hereditario letal conocido como enfermedad de Pompe. Este investigador sugirió que, en ausencia de la glucosidasa alfa, el glucógeno no digerido se acumula en los lisosomas, lo que aumenta el volumen de estos organelos, con daño irreversible de las células y tejidos. Las enfermedades de este tipo, caracterizadas por la deficiencia de una sola enzima lisosómica y la acumulación correspondiente del sustrato no degradado (fig. 1), se conocen como **enfermedades por almacenamiento lisosómico**. Se han descrito más de 40 anomalías de este tipo y afectan a casi uno de cada 8 000 lactantes. El cuadro 1 lista las enfermedades ocasionadas por la acumulación de esfingolípidos no degradados. Los síntomas de las anormalidades por almacenamiento

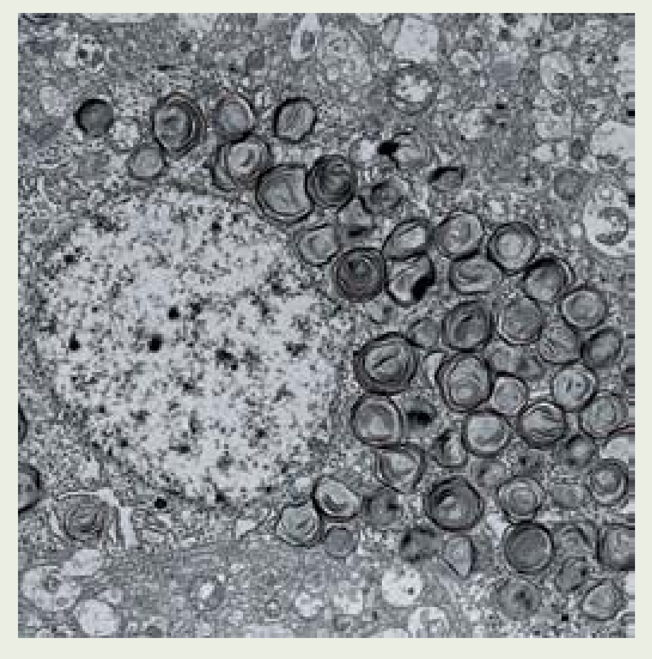


FIGURA 1 Trastornos por almacenamiento lisosómico. Micrografía electrónica de una porción de la neurona de una persona con una enfermedad por almacenamiento lisosómico caracterizada por incapacidad para degradar los gangliósidos G_{M2}. Estas vacuolas citoplásmicas captan la tinción para las enzimas lisosómicas y el gangliósido, lo que indica que son lisosomas en los que se acumularon los glucolípidos no digeridos. (Cortesía de Kinuko Susuki.)

Cuadro 1 Enfermedades por almacenamiento de esfingolípidos

Enfermedad	Deficiencia enzimática	Principal sustancia almacenada	Consecuencias
Gangliosidosis G_{M1}	Galactosidasa β G_{M1}	Gangliósido G_{M1}	Retraso mental, crecimiento hepático, compromiso esquelético, muerte alrededor de los dos años de edad
Enfermedad de Tay-Sachs	Hexosaminidasa A	Gangliósido G_{M2}	Retraso mental, ceguera, muerte alrededor de los tres años de edad
Enfermedad de Fabry	α-galactosidasa A	Trihexosilceramida	Erupción cutánea, insuficiencia renal, dolor en extremidades inferiores
Enfermedad de Sandhoff	Hexosaminidasas A y B	Gangliósido G_{M2} y globósido	Similar a la enfermedad de Tay-Sachs, pero con progresión más rápida
Enfermedad de Gaucher	Glucocerebrosidasa	Glucocerebrósido	Crecimiento de hígado y bazo, erosión de huesos largos, retraso mental sólo en la forma infantil
Enfermedad de Niemann-Pick	Esfingomielinasa	Esfingomielina	Crecimiento del hígado y bazo, retraso mental
Lipogranulomatosis de Farber	Ceramidasa	Ceramida	Deformación progresiva y dolorosa de las articulaciones, nódulos cutáneos, muerte en unos cuantos años
Enfermedad de Krabbe	Galactocerebrosidasa	Galactocerebrósido	Pérdida de mielina, retraso mental, muerte alrededor de los dos años de edad
Lipidosis sulfatada	Arilsulfatasa A	Sulfatos	Retraso mental, muerte en el primer decenio

lisosómico son variables, desde muy graves hasta apenas detectables, según sea el grado de disfunción enzimática. Varias enfermedades se han rastreado hasta mutaciones en proteínas de la membrana lisosómica las cuales alteran el transporte de sustancias al citosol.

Entre las enfermedades por almacenamiento lisosómico mejor estudiadas está la enfermedad de Tay-Sachs, consecutiva a la deficiencia de la enzima β-*N*-hexosaminidasa A, que degrada el gangliósido G_{M2} (fig. 4-6). El G_{M2} es el principal componente de las membranas de las células cerebrales y, en ausencia de la enzima hidrolítica, el gangliósido se acumula en los lisosomas hinchados de las células cerebrales (fig. 1), lo que provoca la disfunción. La forma grave de la enfermedad, que se manifiesta durante la lactancia, se caracteriza por retraso mental y motor progresivo, así como anormalidades esqueléticas, cardiacas y respiratorias. La afección es muy rara en la población general, pero alcanzó una incidencia de hasta uno en 3 600 recién nacidos entre los judíos originarios de Europa del este. La incidencia de la enfermedad ha disminuido de modo notorio en este grupo étnico en los últimos años por la identificación de portadores, la asesoría genética a los padres con riesgo y el diagnóstico prenatal por amniocentesis. De hecho, todas las enfermedades por almacenamiento lisosómico conocidas pueden diagnosticarse antes del nacimiento.

En los últimos años, los prospectos para los tratamientos de enfermedades por almacenamiento lisosómico han mejorado con la demostración de los síntomas de la enfermedad de Gaucher, una deficiencia de la enzima lisosómica glucocerebrosidasa, pueden aliviarse con *tratamiento de reposición enzimática*. Los lactantes con enfermedad de Gaucher acumulan grandes cantidades de lípidos glucocerebrósidos en los lisosomas de los macrófagos, lo que ocasiona crecimiento esplénico y anemia. Los intentos iniciales para corregir la enfermedad con la infusión de una solución de la enzima humana normal a la sangre no tuvieron éxito porque las células hepáticas captaban la enzima, y éstas no están muy afectadas por la deficiencia. Para dirigirla a los macrófagos, la enzima se purificó a partir de tejido placentario humano y se trató con tres glucosidasas diferentes a fin de retirar los azúcares terminales de las cadenas de oligosacáridos de la enzima, lo cual exponía los residuos de manosa subyacentes (véase fig. 8-22). Después de la infusión a la sangre, los receptores para manosa de la superficie de los macrófagos reconocen esta enzima modificada, la cual se capta de inmediato por endocitosis mediada por receptores (pág. 311). Como los lisosomas son el blanco natural de los materiales que ingresaron al macrófago por endocitosis, las enzimas llegan a los sitios precisos de la célula donde se manifiesta la deficiencia. Miles de pacientes con esta enfermedad han recibido tratamiento con éxito de esta forma. Las pruebas clínicas con tratamiento de reposición enzimática para varias anomalías por almacenamiento lisosómico también muestran resultados alentadores. Por desgracia, muchas de estas afecciones lesionan el sistema nervioso central, que es incapaz de captar las enzimas circulantes en la sangre por la barrera hematoencefálica (pág. 265).

Un método alternativo que ha resultado promisorio en ensayos preclínicos se conoce como *terapia de reducción de sustrato*, en la cual se administran fármacos de bajo peso molecular para inhibir la síntesis de las sustancias que se acumulan en la enfermedad. Por último puede mencionarse que, si bien conlleva considerable riesgo para el paciente, el trasplante de médula ósea (o sangre de cordón umbilical) ha resultado relativamente exitoso para tratar algunas de estas enfermedades. Se piensa que las células ajenas trasplantadas, que contienen copias normales del gen en cuestión, secretan una cantidad limitada de enzima lisosómica normal. Algunas de las moléculas de estas enzimas son captadas entonces por las células del propio paciente, lo cual aminora el impacto de la deficiencia de enzima.

8.7 VACUOLAS DE LAS CÉLULAS VEGETALES

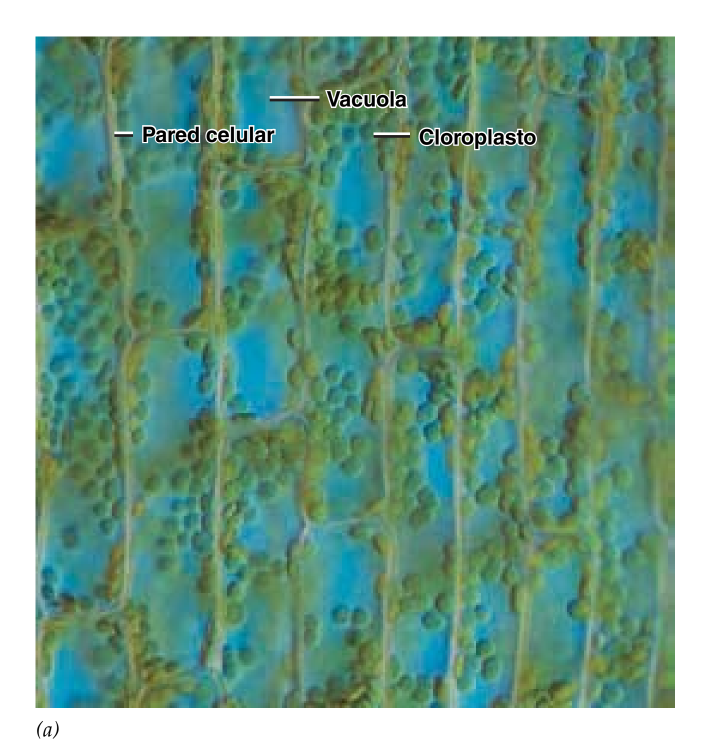
Hasta 90% del volumen de muchas células vegetales está ocupado por una sola **vacuola** central llena con líquido y limitada por una membrana (fig. 8-36). Aunque su estructura es sencilla, las vacuolas vegetales realizan una gran variedad de funciones esenciales. Muchos de los solutos y macromoléculas de una célula, incluidos iones, azúcares, aminoácidos, proteínas y polisacáridos, se almacenan en forma temporal en la vacuola. Las vacuolas también pueden almacenar muchos compuestos tóxicos. Algunos de estos compuestos (como los glucósidos que contienen cianuro y los glucosinolatos) son parte de un arsenal de armas químicas que se liberan cuando la célula sufre el ataque de un herbívoro o un hongo. Otros compuestos tóxicos tan sólo son productos intermediarios de reacciones metabólicas; como las plantas carecen del tipo de sistemas secretores que se encuentran en los animales, utilizan sus vacuolas para aislar estos productos intermediarios del resto de la célula. Algunos de dichos compuestos, como la digital, tienen un valor clínico importante demostrado.

La membrana que limita la vacuola, el **tonoplasto**, contiene diversos sistemas de transporte activo que bombean iones hacia el compartimiento vacuolar a una concentración mucho mayor de la que se encuentra en el citoplasma o el líquido extracelular. A causa de esta gran concentración, el agua entra a la vacuola por ósmosis. La presión hidrostática (turgencia) que ejerce la vacuola no sólo suministra soporte mecánico a los tejidos blandos de una planta (pág. 149), sino que también estira la pared celular durante el crecimiento de la célula.

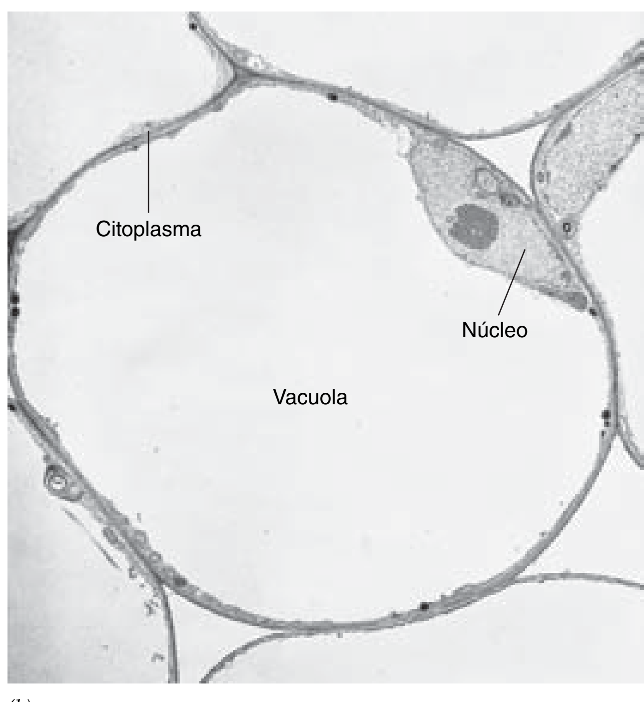
Las vacuolas vegetales también son sitios de digestión intracelular, no muy distintos a los lisosomas, que no existen en las plantas. De hecho, las vacuolas vegetales tienen algunas de las mismas hidrolasas ácidas que se encuentran en los lisosomas. El pH de la vacuola se mantiene en un valor bajo por acción de una ATP-asa de H^+ de tipo V (pág. 159) dentro del tonoplasto que bombea protones hacia el líquido vacuolar. Al igual que las proteínas del lisosoma, muchas de las proteínas de una vacuola vegetal se sintetizan en los ribosomas unidos a la membrana del RER, se transportan por el aparato de Golgi y se separan en la cara *trans* del aparato de Golgi antes de dirigirse a la vacuola.

REVISIÓN

1. Describa tres funciones distintas de las vacuolas vegetales.
2. ¿Qué similitudes tienen una vacuola vegetal y un lisosoma?, ¿en qué se diferencian?



(a)



(b)

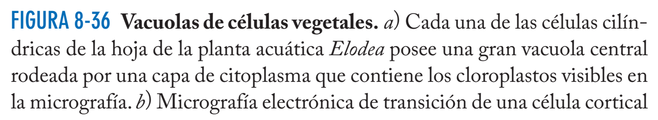


FIGURA 8-36 Vacuolas de células vegetales. *a)* Cada una de las células cilíndricas de la hoja de la planta acuática *Elodea* posee una gran vacuola central rodeada por una capa de citoplasma que contiene los cloroplastos visibles en la micrografía. *b)* Micrografía electrónica de transición de una célula cortical de un frijol de soya que muestra la vacuola central grande y la delgada capa de citoplasma que la rodea. (*A*, TOMADA DE M. I. WALKER/PHOTO RESEARCHERS; *B*, TOMADA DE M. F. BROWN/VISUALS UNLIMITED.)

8.8 LA VÍA ENDOCÍTICA: MOVIMIENTO DE MEMBRANA Y MATERIALES DENTRO DE LA CÉLULA

Ya se describió con detalle cómo una célula transporta materiales del RER y el aparato de Golgi a la membrana plasmática y al espacio extracelular. Ahora se describirá el movimiento de materiales en el sentido contrario. En el capítulo 4 se consideró la forma en que los solutos de bajo peso molecular pasan por la membrana plasmática, pero ¿cómo son las células capaces de incluir materiales que son demasiado grandes para penetrar su membrana sin importar sus propiedades de impermeabilidad?, ¿y cómo se reciclan las proteínas que residen en la membrana plasmática a los compartimientos interiores? Estos dos requerimientos se cumplen con la vía endocítica, en la que segmentos de la membrana plasmática se invaginan para formar vesículas citoplásmicas que se transportan al interior de la célula. En esta sección del capítulo se consideran dos procesos básicos, la endocitosis y la fagocitosis, que ocurren por mecanismos distintos. La **endocitosis** es un proceso por el cual la célula interioriza los receptores de la superficie celular y los ligandos extracelulares unidos a ellos. La **fagocitosis** describe la captación de partículas.

Endocitosis

En términos amplios, la endocitosis puede dividirse en dos categorías: la endocitosis por volumen y la endocitosis mediada por receptor. La *endocitosis por volumen* (también conocida como *pinocitosis*) es la captación inespecífica de líquidos extracelulares. Cualquier molécula, grande o pequeña, que esté presente en el líquido abarcado también entra a la célula. La endocitosis por volumen puede visualizarse con la adición de una sustancia al medio de cultivo, como el tinte amarillo lucifer o la enzima peroxidasa del rábano picante que captan las células en forma inespecífica. La endocitosis por volumen también retira porciones de la membrana plasmática y puede funcionar sobre todo en el reciclaje de membrana entre la superficie celular y los compartimientos interiores. En cambio, la **endocitosis mediada por receptor** se refiere a la captación de macromoléculas extracelulares específicas (ligandos) después de su unión con receptores en la superficie externa de la membrana plasmática.

Endocitosis mediada por receptor y el papel de los fosos cubiertos La endocitosis mediada por receptor (RME) proporciona un medio para la captación selectiva y eficiente de macromoléculas que pueden estar presentes en concentraciones relativamente bajas en el líquido extracelular. Las células tienen receptores para la captación de muchos tipos diferentes de ligandos, incluidas hormonas, factores de crecimiento, enzimas y proteínas sanguíneas que transportan ciertos nutrimentos. Las sustancias que ingresan a la célula mediante la RME se unen con los receptores que se reúnen en dominios especializados de la membrana plasmática, conocidos como **fosos cubiertos**. Los receptores se concentran en fosos cubiertos con un nivel 10 a 20 veces mayor que en el resto de la membrana plasmática. Los fosos cubiertos (fig. 8-37*a*) se reconocen en las micrografías electrónicas como sitios en los que la superficie está hundida y la membrana plasmática está cubierta en su cara citoplásmica

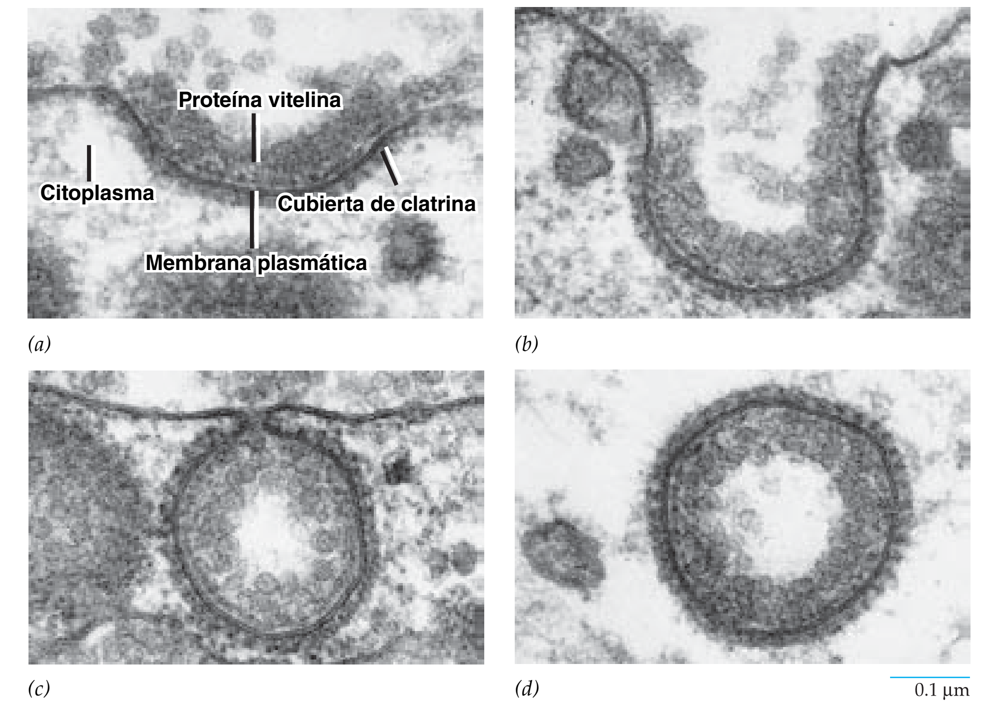


FIGURA 8-37 Endocitosis mediada por receptor. Esta secuencia de micrografías muestra los pasos de la captación de lipoproteínas vitelinas por parte del oocito de gallina. *a)* Las proteínas que capta la célula se concentran en la superficie extracelular de una región invaginada de la membrana plasmática y forman un foso cubierto. La superficie citosólica de la membrana plasmática del foso cubierto está protegida con una capa de material erizado electrodenso formado por la proteína clatrina. *b)* El foso cubierto se colapsa para formar una yema cubierta. *c)* La membrana plasmática está a punto de separarse como vesícula con la proteína vitelina en su superficie luminal (antes extracelular) y la clatrina en la superficie citosólica. *d)* Una vesícula cubierta que ya no está unida a la membrana plasmática. El siguiente paso en el proceso es la liberación de la cubierta de clatrina. (Tomada de M. M. Perry y A. B. Gilbert, J Cell Science 39:257, 1979. Con autorización de the Company of Biologists, Ltd.)

con una cubierta electrodensa erizada que contiene clatrina, la misma proteína que se encuentra en la cubierta proteica de las vesículas formadas en la red *trans* de Golgi (pág. 304). Los fosos cubiertos se invaginan en el citoplasma (fig. 8-37*b*) y luego se liberan de la membrana plasmática para formar vesículas cubiertas (fig. 8-37*c*, *d*). Para comprender el mecanismo de la formación de vesículas cubiertas es necesario examinar la estructura molecular de la cubierta de clatrina.

La figura 8-38 muestra un foso cubierto como se ve desde las superficies extracelular y citoplásmica de las membranas plasmáticas de las células que realizan la endocitosis mediada por receptor. Cuando se ve desde la superficie citoplásmica (fig. 8-38*b*, *c*), la cubierta erizada parece consistir en una red de hexágonos parecidos a un panal de abejas. La construcción geométrica de la cubierta deriva de la estructura de sus bloques constituyentes de clatrina. Cada molécula de clatrina consiste en

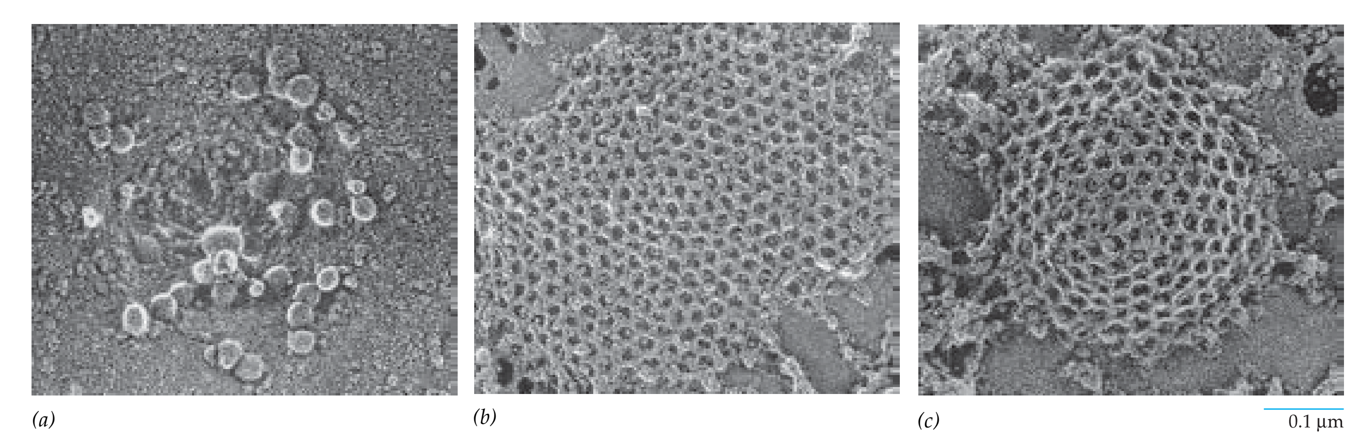


FIGURA 8-38 Fosos cubiertos. *a)* Micrografía electrónica de una réplica formada sobre la superficie extracelular de un fibroblasto congelado y secado que se había incubado con LDL-colesterol. Las partículas de LDL-colesterol son visibles como gotitas localizadas en la *superficie extracelular* del foso cubierto. *b)* Micrografía electrónica de una réplica formada en la *superficie citosólica* de un foso cubierto de un fibroblasto roto. La cubierta se integra con una red aplanada de polígonos que contienen clatrina relacionados con la superficie interna de la membrana plasmática. *c)* Micrografía electrónica de la superficie citosólica que muestra la membrana plasmática invaginada rodeada por una celosía de clatrina que asumió una forma hemisférica. (*A-C*, tomadas de John Heuser y Louise Evans, J Cell Biol 84:568, 1980. Con autorización de los derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

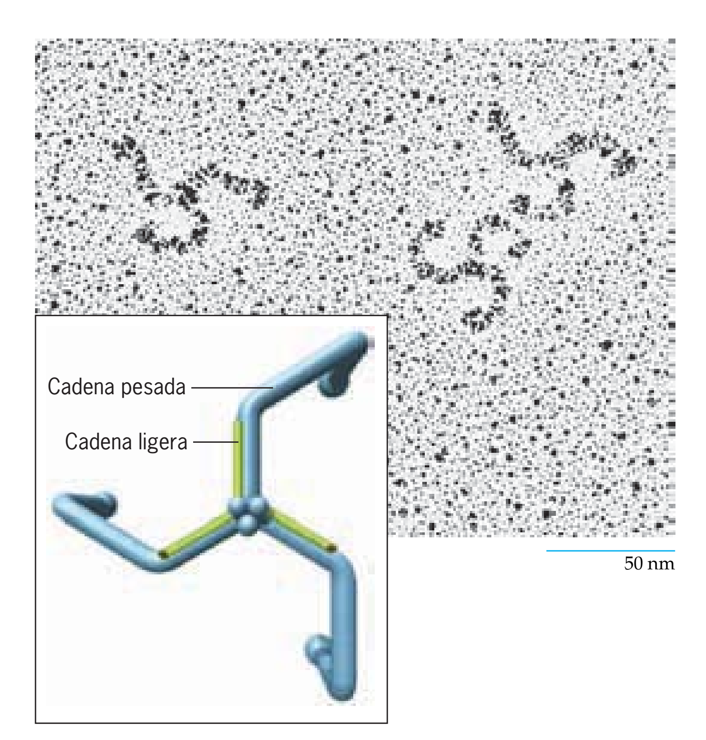


FIGURA 8-39 Módulos trípodes de clatrina. Micrografía electrónica de una preparación con sombreado metálico de módulos trípodes de clatrina. El recuadro muestra el módulo trípode formado por tres cadenas pesadas. La porción interna de cada cadena pesada está unida con una cadena ligera más pequeña. (Reimpresa con autorización de Ernst Ungewickell y Daniel Branton, Nature 289:421, 1981. © 1981, Macmillan Magazines Ltd.)

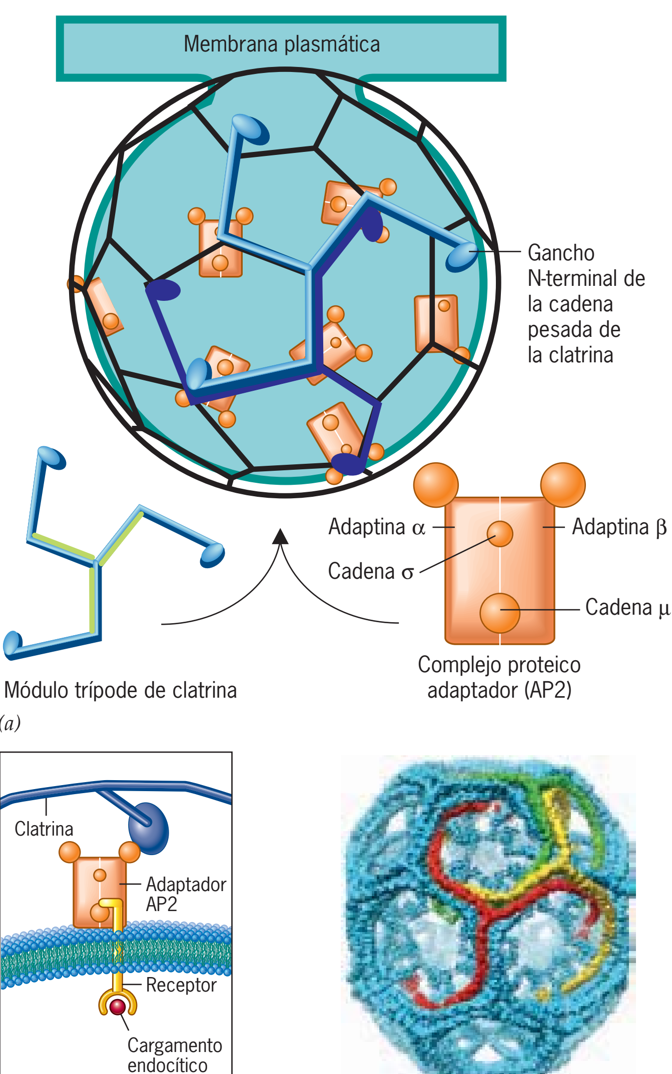


FIGURA 8-40 Organización molecular de una vesícula cubierta. *a)* Esquema de la superficie de una vesícula cubierta que muestra la disposición de los módulos trípodes y adaptadores en la cubierta externa de clatrina. Los lados de los polígonos se forman con partes de las ramas de los módulos superpuestos. El extremo N de cada cadena pesada de clatrina forma un "gancho" que sobresale hacia la superficie de la membrana, donde se une con un adaptador. Cada adaptador consiste en cuatro subunidades de polipéptidos diferentes, que en conjunto dan a la proteína la apariencia de una cabeza con orejas. Los adaptadores se unen con diversas proteínas accesorias que no se muestran en esta ilustración. Los ganchos y los adaptadores se sitúan en los vértices de los poliedros. (*Nota:* no todos los módulos trípodes de la celosía se muestran en esta figura; si así fuera, cada vértice tendría un gancho de clatrina y un adaptador relacionado.) *b)* Esquema de un corte transversal a través de la superficie de una vesícula cubierta que muestra las interacciones de los complejos de adaptador AP2 con la cubierta de clatrina y los receptores de membrana. Cada receptor está unido con un ligando que se interioriza. *c)* Reconstrucción de una jaula de clatrina que contiene 36 trisqueliones; se muestra la disposición superpuesta de varias de estas moléculas triméricas (en diferentes colores). (*A*, reproducida con autorización de S. Schmid, Annual Review of Biochemistry, vol. 66. © 1997 por Annual Reviews. *C*, reimpresa con autorización de Alexander Fotin, et al., Nature 432:574, 2004, cortesía de Stephen C. Harrison; © Copyright 2004, Macmillan Magazines Ltd.)

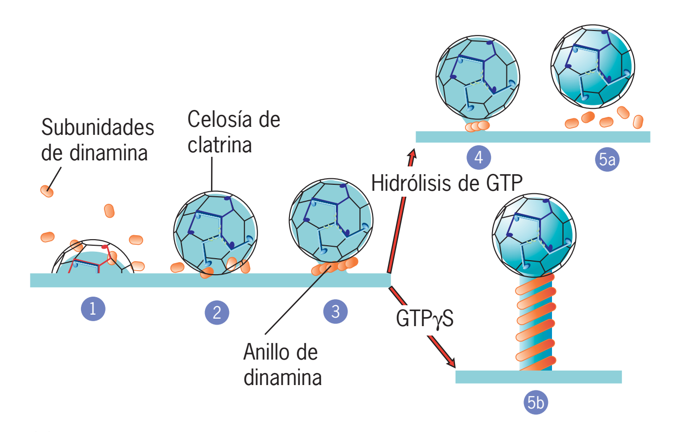
tres cadenas pesadas y tres ligeras unidas para formar un ensamble de tres ramas llamado módulo trípode de clatrina (*trisquelion*) (fig. 8-39). La disposición superpuesta de los trisqueliones dentro del andamiaje de clatrina de una vesícula cubierta se muestra en la figura 8-40. Cada miembro de un trisquelion de clatrina se extiende hacia fuera en dos aristas de un polígono. Las moléculas de clatrina se superponen de modo que cada vértice de un polígono contiene un centro de uno de los trisqueliones componentes.

Al igual que las vesículas cubiertas con clatrina que se desprenden de la TGN (pág. 304), las vesículas cubiertas que se forman durante la endocitosis también contienen una capa de adaptadores complejos situados entre la celosía de clatrina y la superficie de la vesícula que queda frente al citosol. El adaptador mejor estudiado que opera en conexión con la endocitosis mediada por clatrina es AP2. A diferencia de los adaptadores de GGA empleados en la TGN que consisten en una sola subunidad con varios dominios (fig. 8-30), los adaptadores AP2 que se incorporan en las vesículas que se desprenden de la membrana plasmática contienen múltiples subunidades con distintas funciones (fig. 8-40). La subunidad μ de los adaptadores AP2 se acopla a las colas citoplásmicas de los receptores específicos en la membrana plasmática, lo que conduce a la concentración de estos receptores seleccionados, y sus moléculas de cargamento unidas, en la vesícula cubierta emergente (se explica mejor en Vías experimentales, pág. 323). En cambio, la subunidad beta-

adaptina de los adaptadores AP2 se une y congrega las moléculas de clatrina de la celosía suprayacente. La disposición superpuesta de los módulos trípodes de clatrina dentro de la pared de la cubierta vesicular y la interacción entre la celosía de clatrina y los adaptadores se muestran en la figura 8-40. La estructura ilustrada en la figura 8-40 es una versión muy simplificada de una vesícula cubierta "real". A diferencia de las vesículas COP-I y COP-II, que tienen una construcción relativamente sencilla, las vesículas cubiertas con clatrina contienen más de dos docenas de proteínas accesorias diferentes que forman una red dinámica de moléculas que interactúan. Se desconocen las funciones de estas proteínas en el reclutamiento del cargamento, ensamble de la cubierta, invaginación de la membrana, interacción con los componentes del citoesqueleto, liberación de la vesícula y desnudamiento de la membrana. La mejor estudiada de estas proteínas accesorias es la dinamina.

La *dinamina* es una proteína de unión con GTP necesaria para la liberación de la vesícula cubierta con clatrina de la membrana en la que se forma. La dinamina se ensambla a sí misma en un collar helicoidal alrededor del cuello de un foso invaginado (fig. 8-41), justo antes que se desprenda de la membrana. En el modelo presentado en la figura 8-41*a*, en los pasos 3 y 4, la hidrólisis del GTP unido por las moléculas polimerizadas de dinamina induce un cambio en la conformación en la hélice de dinamina que corta la vesícula cubierta de la membrana plasmática. De acuerdo con este modelo, la dinamina actúa como una enzima capaz de utilizar la energía química de GTP para generar fuerzas mecánicas. De acuerdo con un modelo alternativo, la dinamina actúa más como cualquier otra proteína G descrita en este capítulo al cambiar la actividad de una proteína efectora separada que corta la vesícula. En el minuto siguiente de su formación, la vesícula endocítica cubierta pierde su cubierta de clatrina y se vuelve una vesícula de superficie lisa que entra a la vía endocítica.

La vía endocítica Las moléculas que capta una célula por endocitosis se mueven en una **vía endocítica** bien definida (fig. 8-42). Antes de describir los fenómenos que ocurren en la vía endocítica, vale la pena considerar dos tipos diferentes de receptores que están sujetos a la endocitosis. Un grupo de receptores, al cual se le denomina "receptores domésticos", es el encargado de la captación de materiales que se utilizan en la célula. Los ejemplos mejor estudiados son los receptores para transferrina y lipoproteína de baja densidad (LDL), que median la entrega a las células del hierro y el colesterol, respectivamente. El receptor para LDL se describe con detalle al final de esta sección. El receptor de color rojo de la figura 8-42 representa un receptor doméstico. El segundo grupo de receptores, al que se conoce como "receptores de señalización", es el encargado de unir los ligandos extracelulares que llevan mensajes que cambian las actividades celulares. Estos ligandos, que incluyen hormonas como la insulina y factores de crecimiento como el EGF, se unen con el receptor de la superficie (mostrado en verde en la figura 8-42) y emiten una señal para respuesta fisiológica dentro de la célula (descrita con detalle en el capítulo 15). La endocitosis del primer grupo de receptores casi siempre deriva en la entrega de los materiales unidos, como el hierro y el colesterol, a la célula, y el receptor regresa luego a la superficie celular para realizar más rondas de captación. La endocitosis del segundo grupo de receptores conduce a menudo a la destrucción del receptor, un proceso llamado *regulación en descenso del receptor*, y que tiene el efecto de reducir la sensibilidad de la célula a la estimulación posterior por la hormona o factor de crecimiento. La regulación en descenso del receptor es un mecanismo por el cual las células regulan su capacidad para responder a los mensajeros extracelulares. Los "receptores de señalización" casi siempre están marcados para la endocitosis y destrucción ulterior por el enlace covalente con una "etiqueta" en la cola citoplásmica del receptor cuando aún está en la superficie celular. La etiqueta es una pequeña proteína llamada ubiquitina que se agrega por medios enzimáticos. Las proteínas de membrana que no se someten en forma usual a la endocitosis se interiorizan si llevan una ubiquitina adicional.



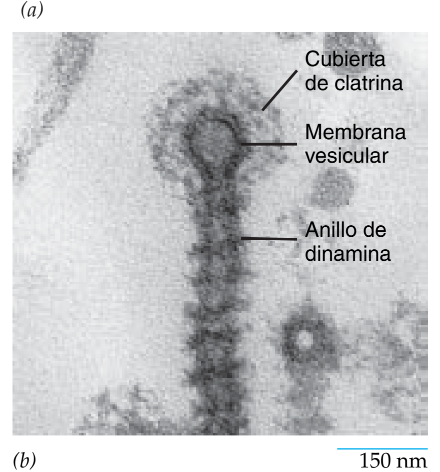


FIGURA 8-41 El papel de la dinamina en la formación de vesículas de clatrina. *a*) La celosía de clatrina de un foso cubierto (paso 1) cambia de configuración para formar una vesícula invaginada conectada con la membrana plasmática suprayacente mediante un tallo (paso 2). En este punto, las subunidades de dinamina, que se concentran en esa región, se polimerizan para formar un anillo alrededor del tallo (paso 3). Los cambios de la conformación del anillo, que al parecer son resultado de la hidrólisis de GTP (paso 4), conducen a la fisión de la vesícula cubierta de la membrana plasmática con desarticulación del anillo de dinamina (paso 5a). Si la gemación de la vesícula ocurre en presencia de GTPγS, un análogo no hidrolizable de GTP, la polimerización de la dinamina continúa más allá de la formación de un simple collar y se produce un túbulo estrecho construido por varias vueltas de la hélice de dinamina (paso 5b). *b*) Micrografía electrónica que muestra una vesícula cubierta que se forma en la presencia de GTPγS, que corresponde a la etapa mostrada en el paso 5b de la parte *a*. (*A*, TOMADA DE P. DE CAMILLI, ET AL., CURRENT OPIN NEUROBIOL, VOL 5, PÁG. 562, 1995; *B*, REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE KOHJI TAKEI, ET AL., NATURE, VOL. 374, CUBIERTA 3/9/95. © 1995, MACMILLAN MAGAZINES, LTD.)

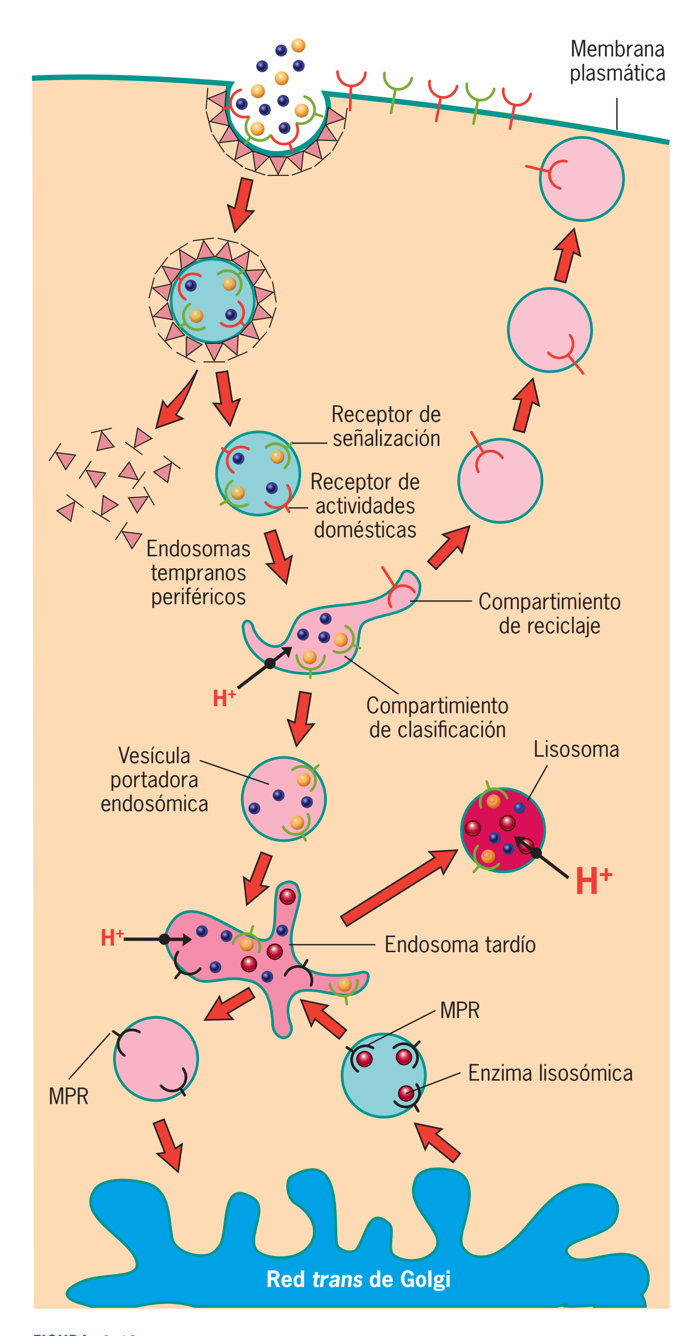


FIGURA 8-42 La vía endocítica. Movimiento de materiales del espacio extracelular a los endosomas tempranos. Se muestra la endocitosis de dos tipos de complejos receptor-ligando. Los receptores de actividades domésticas, como el receptor para LDL (mostrado en rojo), se envían de regreso a la membrana plasmática, mientras que sus ligandos (esferas azules) se transfieren a los endosomas tardíos. Los receptores de señalización, como el receptor EGF (mostrado en verde), casi siempre se transportan a los endosomas tardíos junto con sus ligandos (naranja-amarillo). Los endosomas tardíos también reciben enzimas lisosómicas recién sintetizadas (esferas rojas) de la red *trans* de Golgi. Estas enzimas se trasladan con receptores para manosa 6-fosfato (MPR), que regresan a la TGN. El contenido de los endosomas tardíos se transfiere a los lisosomas por varias rutas (no se muestran).

Después de la interiorización, los materiales unidos con la vesícula se transportan a una red dinámica de túbulos y vesículas conocida en conjunto como **endosomas**, que representan los centros de distribución a lo largo de la vía endocítica. El líquido de la luz de los endosomas se acidifica por efecto de una ATP-asa de H^+ en la membrana limitante. Los endosomas se dividen en dos clases diferentes, los **endosomas tempranos**, que casi siempre se localizan cerca de la región periférica de la célula, y los **endosomas tardíos**, que por lo general se hallan más cerca del núcleo. Los endosomas tempranos y tardíos pueden distinguirse unos de otros por su densidad boyante (que permite aislarlos en diferentes fracciones en un gradiente de densidad), pH y composición proteica. Además, los endosomas tardíos pueden contener cantidades considerables de membrana interna que surge de las invaginaciones de la membrana limitante. Estas vesículas internas a menudo contienen proteínas de la membrana plasmática que van en camino para ser destruidas.

Los receptores que se captan por endocitosis se transportan en vesículas a un endosoma temprano, el cual sirve como estación clasificadora que dirige los distintos tipos de receptores y ligandos por vías diferentes (fig. 8-42). Los "receptores de tareas domésticas" casi siempre se separan de sus ligandos en el ambiente endosómico ácido y luego se concentran en compartimientos tubulares especializados del endosoma temprano, que representan centros de reciclaje. Las vesículas que se forman de estos túbulos llevan a los receptores de regreso a la membrana plasmática para efectuar más rondas de endocitosis (fig. 8-42). En cambio, los ligandos liberados (p. ej., LDL) se concentran en un compartimiento de clasificación antes de enviarse hacia un endosoma tardío y al final a un lisosoma, donde ocurre el procesamiento final. Como ya se dijo, los "receptores de señalización" con sus marcas de ubiquitina no recirculan a la membrana, sino que son enviados hacia lisosomas y endosomas tardíos para ser destruidos (fig. 8-42).

Metabolismo de LDL y colesterol Entre muchos ejemplos de endocitosis mediada por receptor, el primero estudiado y mejor comprendido es el que aporta a las células animales el colesterol exógeno. Las células animales utilizan el colesterol como parte esencial de sus membranas plasmáticas y como precursor de las hormonas esteroideas. El colesterol es una molécula hidrófoba que se transporta en la sangre como parte de enormes complejos de lipoproteína, por ejemplo la *lipoproteína de baja densidad* (LDL) que se muestra en la figura 8-43. Cada partícula de LDL contiene un centro de unas 1 500 moléculas de colesterol esterificadas en ácidos grasos de cadenas largas. El centro está rodeado por una sola capa de fosfolípidos que contiene una sola copia de una proteína grande, llamada *apolipoproteína B-100,* que se une en forma específica con los receptores para LDL en la superficie de las células.

Los receptores para LDL se transportan a la membrana plasmática de las células, donde se concentra en los fosos cubiertos, incluso en ausencia de ligando. Como resultado, los receptores se hallan en la superficie celular, listos para captar las lipoproteínas de la sangre si están disponibles. Una vez que la LDL se une con un foso cubierto, éste se invagina para formar una vesícula cubierta, la cubierta de clatrina se desarma y los receptores de LDL se reciclan de nueva cuenta a la membrana plasmática, como se muestra en la figura 8-42. Mientras tanto, las partículas de LDL se trasladan a los lisosomas, donde el componente proteico se degrada y el colesterol se desesterifica para que la célula lo utilice en la formación de membrana o en otros procesos metabólicos

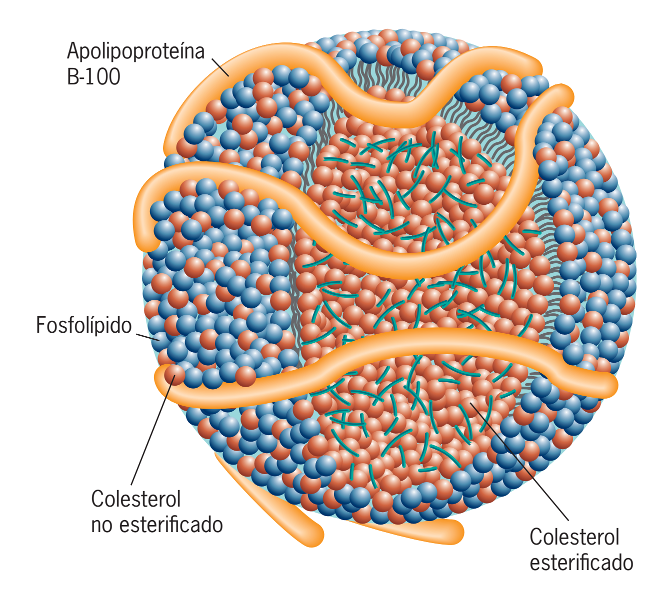


FIGURA 8-43 Colesterol LDL. Cada partícula se integra con moléculas de colesterol esterificado, rodeadas por una capa monomolecular mixta de fosfolípidos y colesterol, además de una sola molécula de la proteína apolipoproteína B-100, que interactúa de manera específica con el receptor LDL que sobresale de la membrana plasmática.

(p. ej., síntesis de hormonas esteroideas). Las personas con un raro trastorno hereditario llamado *enfermedad de Niemann-Pick tipo C* carecen de una de las proteínas necesarias para transferir el colesterol fuera de los lisosomas. La acumulación resultante de colesterol en estos organelos causa degeneración nerviosa y muerte durante la lactancia temprana. En la sección Vías experimentales se describen con detalle los estudios de una enfermedad diferente que condujo al descubrimiento de la endocitosis mediada por receptor y la interiorización de la LDL.

El nivel de LDL en sangre se relaciona con el desarrollo de ateroesclerosis, un trastorno caracterizado por la formación de placas en las paredes de las arterias que disminuyen el flujo sanguíneo por los vasos y actúan como nichos para la formación de coágulos sanguíneos. Los coágulos que bloquean las arterias coronarias son la principal causa de infartos miocárdicos (ataque al corazón). Los estudios sugieren que la ateroesclerosis se debe a la reacción inflamatoria crónica que se inicia por el depósito de LDL en las paredes internas de los vasos sanguíneos, como se indica en la figura 8-44. La reducción de los niveles de LDL es más fácil de lograr si se administran medicamentos llamados *estatinas* (p. ej., lovastatina y pravastatina) que bloquean la acción de la reductasa de HMG-CoA, una enzima clave para la síntesis de colesterol (pág. 322). Cuando los niveles sanguíneos de colesterol disminuyen, el riesgo de un infarto cardiaco baja también.

Las LDL no son los únicos agentes transportadores de colesterol en la sangre. Las *lipoproteínas de alta densidad* (HDL) tienen una construcción similar, pero poseen una proteína distinta (apolipoproteína A-I) y una función diferente en el cuerpo. La LDL sirve sobre todo para transportar en la sangre moléculas de colesterol, del hígado, donde se sintetizan y empacan, a todas las células del cuerpo. La HDL transporta colesterol en el sentido contrario. El exceso de colesterol se traslada fuera de la membrana plasmática de las células del cuerpo a las partículas de HDL circulantes, las cuales llevan el colesterol al hígado para su excreción. Tal y como los niveles sanguíneos elevados de LDL se relacionan con un mayor riesgo de enfermedad cardiaca, los niveles sanguíneos altos de HDL se vinculan con un menor riesgo, lo cual hizo que la HDL se llamara "colesterol bueno". No obstante, el asunto no es tan sencillo. Por ejemplo, las moléculas de colesterol pueden transformarse de HDL en LDL mediante una enzima llamada proteína de transferencia de éster de colesterilo (CETP), una actividad que tiende a reducir los niveles de colesterol HDL. La CETP se convirtió en el centro de investigaciones después del descubrimiento de familias japonesas

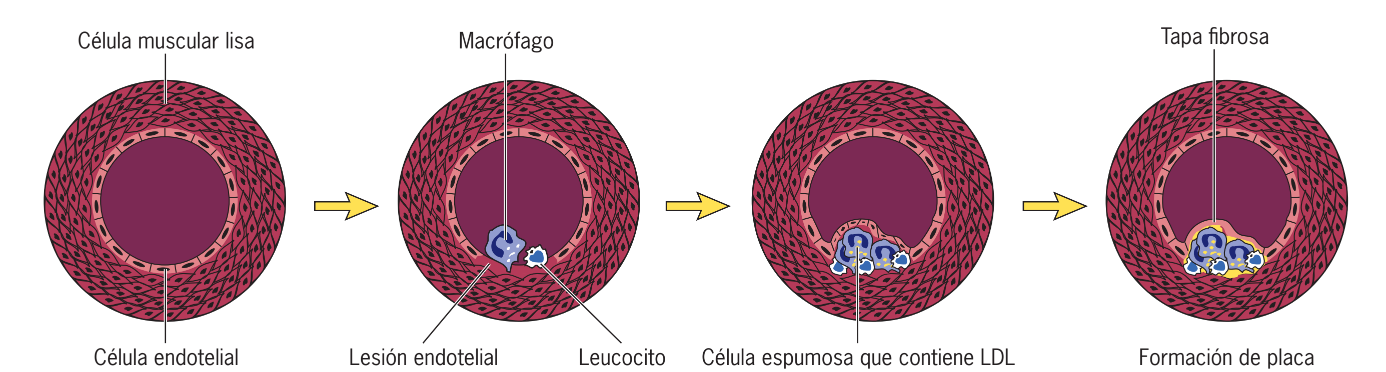


FIGURA 8-44 Un modelo de la formación de la placa ateroesclerótica. De acuerdo con este modelo, la formación de la placa se inicia con varios tipos de lesiones en las células endoteliales que recubren el vaso sanguíneo, incluido el daño causado por los radicales libres de oxígeno que alteran la estructura química de las partículas de LDL-colesterol. El endotelio lesionado actúa como atrayente para los leucocitos y macrófagos, los cuales migran por debajo del endotelio y permanecen ahí. Los macrófagos ingieren la LDL oxidada, la cual se deposita en el citoplasma como gotitas de ácido ricas en colesterol. Estos macrófagos se conocen como células espumosas. Las sustancias liberadas por los macrófagos estimulan la proliferación de células musculares lisas, las cuales producen una matriz densa de tejido conjuntivo fibroso (tapa fibrosa) que produce un abultamiento en la luz arterial. Estas lesiones abultadas no sólo limitan el flujo sanguíneo, sino que tienden a romperse, lo cual desencadena la formación de un coágulo y un ataque cardiaco.

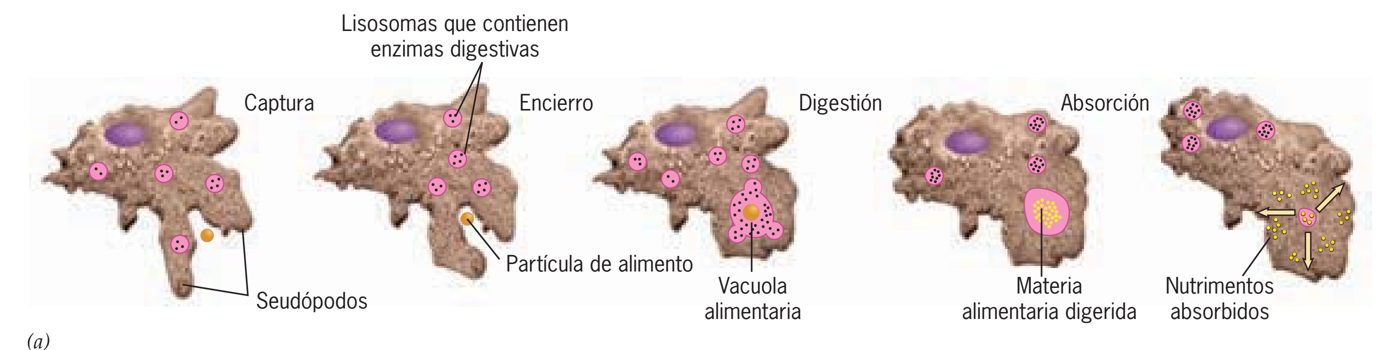
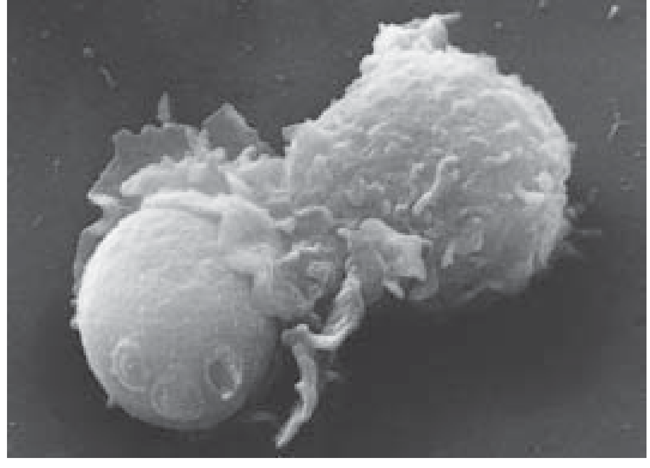


FIGURA 8-45 Fagocitosis. *a*) Esquema de los pasos en el encierro, digestión y absorción de materiales captados por una ameba mediante fagocitosis. *b*) Proceso de encierro ilustrado por un leucocito polimorfonuclear que ingiere una partícula de levadura. (*B*, TOMADA DE JANET BOYLES Y DOROTHY F. BAINTON. CELL 24:906, 1981. CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS.)



cuyos integrantes vivían más de 100 años y tenían mutaciones en el gen *CETP*. Varios inhibidores de CETP de bajo peso molecular se han sometido a ensayos clínicos, y se observa que incrementan en gran medida las concentraciones sanguíneas de HDL. Actualmente se investiga si esta respuesta se correlaciona o no con un menor nivel de coronariopatía.

Fagocitosis

La fagocitosis (cuando la célula "come") es tarea extensa de unos cuantos tipos de células especializadas en la captación de partículas relativamente grandes (>0.5 μm de diámetro) del ambiente. Muchos protistas unicelulares, como las amebas y los ciliados, viven porque atrapan partículas de alimento y microorganismos más pequeños y los encierran dentro de pliegues de su membrana plasmática (fig. 8-45*a*). Los pliegues se fusionan para formar una vacuola (o *fagosoma*) que se separa de la membrana plasmática hacia el interior. El fagosoma se fusiona con un lisosoma y el material se digiere dentro del *fagolisosoma* resultante.

En la mayoría de los animales, la fagocitosis es un mecanismo protector en lugar de una forma de alimentación. Los mamíferos tienen diversos fagocitos "profesionales", incluidos los neutrófilos y los macrófagos, que viajan por la sangre y los tejidos para fagocitar a los microorganismos invasores, células dañadas y moribundas y detritos. Las células fagocíticas reconocen a los materiales y los unen mediante receptores en su superficie antes de captarlos. Una vez dentro del fagocito, los microorganismos pueden destruirse con las enzimas lisosómicas o con radicales libres de oxígeno generados dentro de la luz del fagosoma. El proceso de inclusión de la partícula se muestra en la micrografía que abre el capítulo y en la figura 8-45*b*. Los pasos de la digestión de los materiales atrapados se ilustran en la figura 8-46. La fagocitosis de partículas materiales se favorece por las actividades contráctiles de los microfilamentos con actina subyacentes a la membrana plasmática.

No todas las bacterias ingeridas por células fagocíticas se destruyen. De hecho, algunas especies secuestran los mecanis-

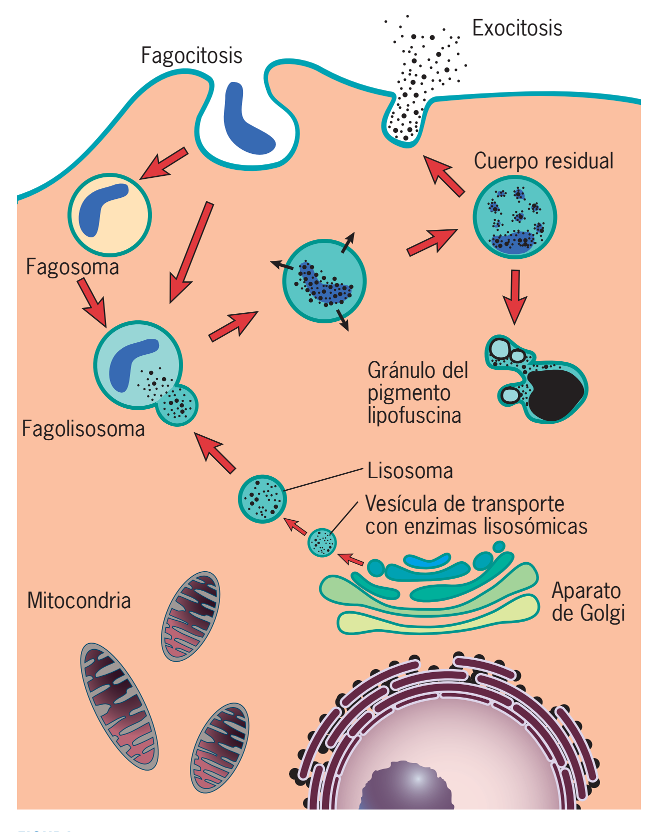


FIGURA 8-46 Resumen de la vía fagocítica.

mos fagocíticos para promover su propia supervivencia en el cuerpo. Por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causante de la tuberculosis, se capta en el citoplasma de un macrófago por fagocitosis, pero los fagosomas en los que se encierra a las bacterias no se fusionan con un lisosoma. El microorganismo encerrado inhibe la fusión de las membranas que conduciría a su destrucción y en lugar de ello se multiplica dentro de la célula. En cambio, la bacteria causante de la fiebre Q *Coxiella burnetii*, se encierra en un fagosoma que se fusiona con un lisosoma, pero ni el ambiente ácido ni las enzimas lisosómicas pueden destruir al patógeno. *Listeria monocytogenes*, una bacteria que causa meningitis, produce proteínas que destruyen la integridad de la membrana lisosómica, lo que permite que la bacteria escape hacia el citosol de la célula (véase fig. 9-67).

REVISIÓN

1. Describa los pasos que ocurren entre la unión de una partícula de LDL a la membrana plasmática de una célula y la entrada de las moléculas de colesterol al citosol.
2. Describa la estructura molecular de la clatrina y la relación entre su estructura y su función.
3. ¿Qué comparación puede establecerse entre el cometido de la fagocitosis en la vida de una ameba y en un animal multicelular?, ¿cuáles son los principales pasos que ocurren durante la fagocitosis?

8.9 CAPTACIÓN DE PROTEÍNAS POR PEROXISOMAS, MITOCONDRIAS Y CLOROPLASTOS DESPUÉS DE LA TRADUCCIÓN

En este capítulo se explicó que el tránsito de proteínas dentro de la célula lo regulan: a) señales clasificadoras, como el péptido de señal de las proteínas secretadas o los grupos fosfato de manosa de las enzimas lisosómicas, y b) receptores que reconocen estas señales y entregan a las proteínas que las tienen al compartimiento apropiado. Cuatro de los principales organelos de la célula (núcleo, mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas) importan proteínas a través de una o más membranas limitantes externas. Como en el caso del retículo endoplásmico rugoso, las proteínas que importan estos organelos contienen secuencias de aminoácidos que sirven como domicilios que reconocen los receptores en la membrana externa del organelo. A diferencia del ER rugoso que casi siempre importa sus proteínas al mismo tiempo de la traducción, las proteínas de estos otros organelos se importan después de la traducción, es decir, luego de su síntesis completa en el citosol.

La importación de proteínas al núcleo es un tema especializado que se trata por separado en la sección 12.1. La importación de proteínas a los peroxisomas, mitocondrias y cloroplastos se explica en las secciones siguientes.

Captación de proteínas en los peroxisomas

Los peroxisomas son organelos muy sencillos que sólo tienen dos compartimientos en los que una proteína importada puede situarse: la membrana limitante y la matriz interna (pág. 207). Las proteínas destinadas a un peroxisoma tienen una *señal de dirección peroxisómica* ya sea una *PTS* para una proteína de la matriz peroxisómica o una *mPTS* para una proteína peroxisómica de la membrana. Se han identificado varios receptores diferentes para PTS, mPTS y PTS. Los receptores PTS se unen con las proteínas destinadas al peroxisoma en el citosol y las envían a la membrana peroxisómica. Al parecer el receptor acompaña a la proteína peroxisómica por la membrana hasta la matriz y luego se recicla en el citosol para acompañar a otra proteína. A diferencia de las mitocondrias y los cloroplastos, cuyas proteínas importadas deben asumir un estado desplegado, de alguna manera los peroxisomas son capaces de importar proteínas de la matriz peroxisómica en su conformación plegada nativa, incluso las que tienen varias subunidades. El mecanismo por el cual los peroxisomas son capaces de realizar esta tarea impactante aún es tema de conjetura.

Captación de proteínas en las mitocondrias

Las mitocondrias tienen cuatro compartimientos a los cuales pueden llegar las proteínas: una membrana mitocondrial externa (OMM), membrana mitocondrial interna (IMM), espacio intermembranoso y matriz (véase fig. 5-3*c*). Aunque las mitocondrias sintetizan unos cuantos de sus polipéptidos integrales de membrana (13 en los mamíferos), alrededor de 99% de las proteínas del organelo se codifica en el genoma nuclear, se sintetiza en el citosol y se importa después de la traducción. Esta descripción se limita a las proteínas de la matriz mitocondrial y a la membrana mitocondrial interna, que juntas constituyen la gran mayoría de las proteínas dirigidas a este organelo. Como sucede con las proteínas peroxisómicas y las proteínas de otros compartimientos, las proteínas mitocondriales contienen secuencias de señalización que las dirigen al sitio a donde pertenecen. Las proteínas de la matriz mitocondrial poseen una secuencia directriz removible (llamada *secuencia previa*) localizada en el extremo N de la molécula (paso 1, fig. 8-47*a*) que incluye varios residuos de carga positiva. En cambio, la mayor parte de las proteínas destinadas a la membrana mitocondrial interna cuenta con secuencias directrices internas que permanecen como parte de la molécula.

Antes que una proteína pueda entrar a una mitocondria, se cree que tienen lugar varios fenómenos. Primero, la proteína debe presentarse a la mitocondria en un estado relativamente desplegado o extendido (pasos 1 y A, fig. 8-47*a*). Varias moléculas chaperonas diferentes (p. ej., Hsp70) participan en la preparación de polipéptidos para su captación en las mitocondrias, incluidas unas que dirigen en forma específica las proteínas mitocondriales a la superficie citosólica de la membrana mitocondrial externa (fig. 8-47*a*). La membrana mitocondrial externa contiene un complejo importador de proteína, el *complejo TOM*, que incluye: a) receptores que reconocen y se unen con proteínas mitocondriales y b) canales recubiertos con proteína por los cuales pasan los polipéptidos desplegados a través de la

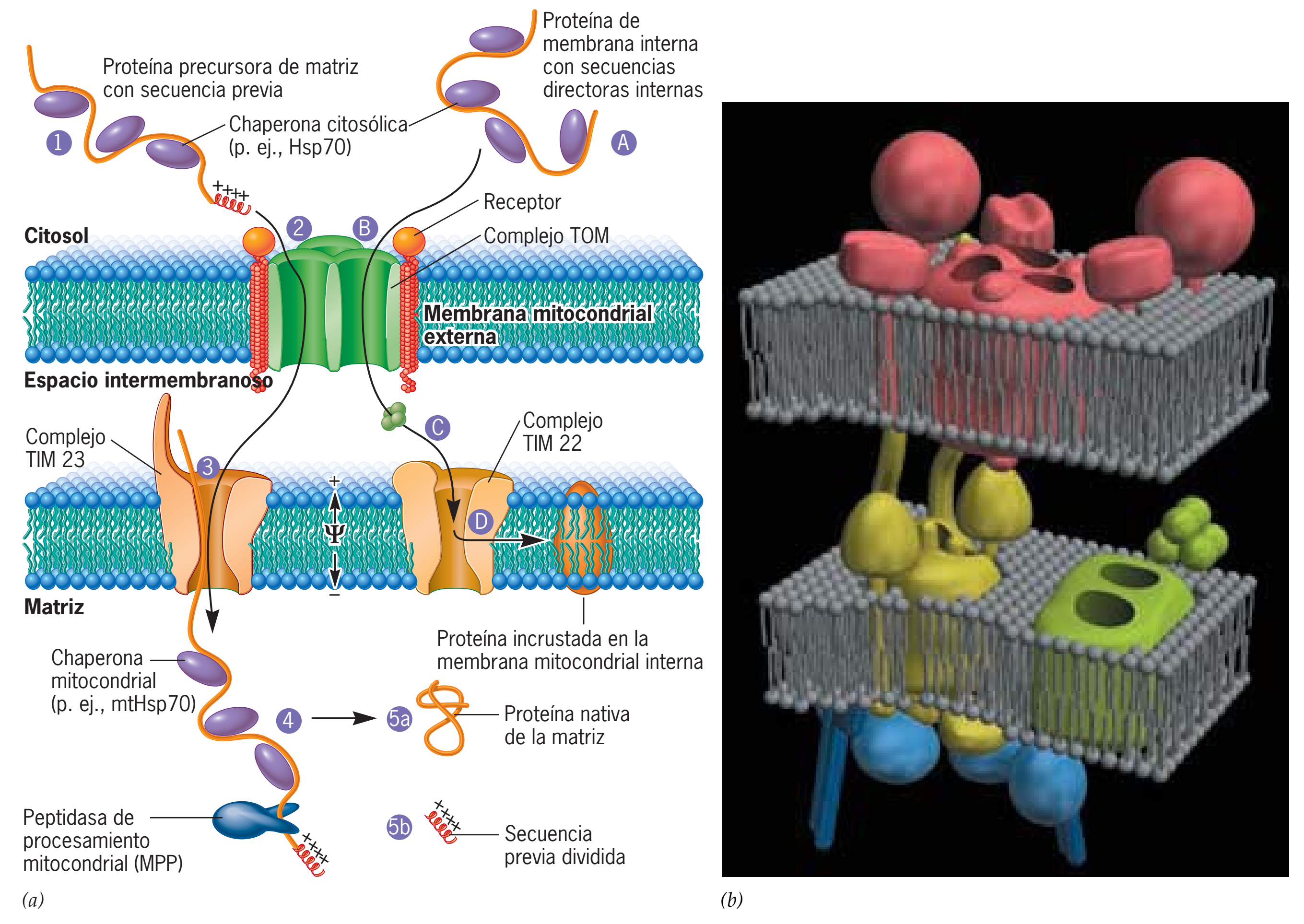


FIGURA 8-47 Importación de proteínas a la mitocondria. *a)* Pasos propuestos de las proteínas importadas después de la traducción en la matriz mitocondrial o la membrana mitocondrial interna. El polipéptido se dirige a una mitocondria gracias a una secuencia directriz, que se localiza en el extremo N en la proteína de la matriz (paso 1) y se halla en la parte interna en la proteína de membrana interna (paso A). Las moléculas citosólicas Hsp70 despliegan el polipéptido antes de su entrada a la mitocondria. Los receptores de membrana (proteínas transmembranosas rojas) reconocen a las proteínas y las trasladan por la membrana mitocondrial externa a través de los poros en el complejo TOM de la membrana mitocondrial externa (paso 2 o B). Las proteínas integrales de la membrana mitocondrial interna se dirigen al complejo TIM22 de la IMM (paso C), lo cual las dirige a la bicapa de lípidos de la IMM (paso D). Las proteínas de la matriz mitocondrial se trasladan por el complejo TIM23 de la IMM (paso 3). Una vez que la proteína entra a la matriz, se le une una chaperona mitocondrial (paso 4), la cual puede tirar del polipéptido hacia la matriz o actuar como un trinquete browniano para asegurar que se difunda hacia la matriz (estos mecanismos alternos de chaperonas se explican en el texto). Una vez en la matriz, la proteína desplegada asume su conformación nativa (paso 5a) con la ayuda de las chaperonas Hsp60 (no se muestran). La secuencia previa se elimina por medios enzimáticos (paso 5b). *b)* Modelo de los mecanismos mitocondriales de importación de proteínas que muestra el número, tamaño relativo y topología de las diversas proteínas incluidas en esta actividad. El complejo TOM es de color rojizo, el complejo TIM23 es amarillo verdoso, el complejo TIM22 es verde y las chaperonas cooperadoras son azules. (*B*, TOMADA DE TOSHIYA ENDO, HAYASHI YAMAMOTO Y MASATOSHI ESAKI, J. CELL SCIENCE, PORTADA DEL VOL. 116, #16, 2003. CON AUTORIZACIÓN DE THE COMPANY OF BIOLOGISTS, LTD.)

membrana externa (pasos 2 y B).[6] Las proteínas destinadas a la membrana mitocondrial interna o la matriz deben pasar por el espacio intermembranoso y acoplarse con un segundo complejo importador de proteínas localizado en la membrana mitocondrial interna, el *complejo TIM.* La IMM tiene dos complejos TIM principales: TIM22, que se une con proteínas integrales de la IMM y las inserta en la bicapa de lípidos (pasos C-D, fig. 8-47*a*), y TIM23, que se une con proteínas de la matriz y las traslada a través de la membrana mitocondrial interna hasta el compartimiento de la matriz acuosa (paso 3). La translocación ocurre en sitios en los que las membranas mitocondriales externa e interna están muy próximas, de manera que la proteína importada puede cruzar ambas membranas al mismo tiempo.

[6]Es interesante señalar que, a diferencia del translocón del ER o el peroxisoma, la proteína formadora del poro del complejo TOM es una proteína de barril beta, como las otras proteínas integrales de la membrana mitocondrial externa (pág. 182), lo que refleja su evolución de la membrana externa de una bacteria ancestral. Esto tiene consecuencias funcionales, como que la proteína de barril beta no pueda abrirse hacia los lados para permitir que las proteínas integrales se inserten en la membrana mitocondrial externa. Como resultado, las proteínas de la OMM tienen que pasar al espacio intermembranoso antes de ingresar a la bicapa de la membrana mitocondrial externa.

El movimiento hacia la matriz está impulsado por el potencial eléctrico a través de la membrana mitocondrial interna que actúa sobre la señal directriz con carga positiva; si se disipa el potencial por la adición de un fármaco como el dinitrofenol (pág. 198), cesa la translocación.

Cuando entra a la matriz, un polipéptido interactúa con las chaperonas mitocondriales, como mtHsp70 (paso 4, fig. 8-47*a*), que median la entrada al compartimiento acuoso. Se han propuesto dos mecanismos para explicar la acción general de las chaperonas participantes en el movimiento de proteínas a través de las membranas, que es un fenómeno muy difundido. De acuerdo con un nuevo punto de vista, las chaperonas actúan como motores generadores de fuerza que usan la energía derivada de la hidrólisis del ATP para "tirar" del polipéptido desplegado a través del poro de translocación. Según un enfoque alternativo, las chaperonas ayudan a la difusión del polipéptido a través de la membrana. La difusión es un proceso aleatorio en el que una molécula puede moverse en cualquier dirección disponible.

Considérese lo que sucedería si un polipéptido desplegado entrara a un poro de translocación en la membrana mitocondrial y "metiera la cabeza" en la matriz. De igual modo, qué sucedería si una chaperona que reside en la superficie interna de la membrana pudiera unirse con el polipéptido sobresaliente de tal forma que bloqueara la difusión del polipéptido de regreso por el poro y hacia el citosol, pero no bloqueara su difusión hacia la matriz. A medida que el polipéptido se difunde cada vez más hacia la matriz, se producirían uniones repetidas con la molécula chaperona y en cada etapa impediría que se difundiera de regreso. Este mecanismo de acción de las chaperonas se conoce como *difusión tendenciosa* y se dice que la chaperona actúa como "trinquete browniano"; el término "browniano" se refiere a la difusión aleatoria y un "trinquete" es un instrumento que permite el movimiento sólo en una dirección. Los estudios recientes sugieren la probabilidad de que se utilicen ambos mecanismos de acción de las moléculas chaperonas y actúen en cooperación. Sin importar cuál sea el mecanismo de entrada, una vez que está en la matriz, el polipéptido obtiene su conformación nativa (paso 5a, fig. 8-47*a*) después de la eliminación enzimática de la secuencia previa (paso 5b).

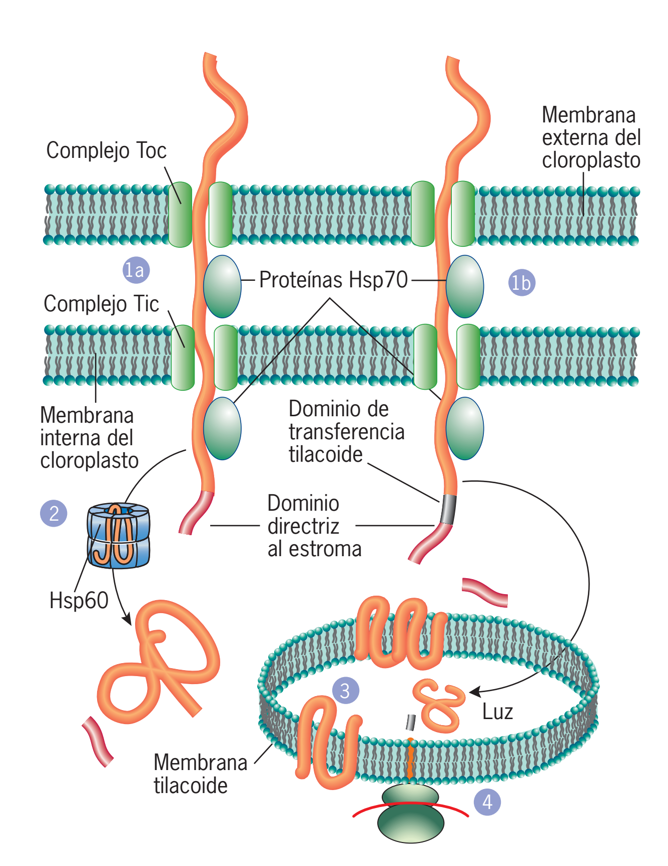


FIGURA 8-48 Importación de proteínas al cloroplasto. Las proteínas codificadas por genes nucleares se sintetizan en el citosol y se importan a través de poros recubiertos con proteína en ambas membranas de la envoltura externa del cloroplasto (paso 1). Las proteínas destinadas al estroma (paso 1a) contienen un dominio directriz al estroma en el extremo N, mientras que las proteínas destinadas al tilacoides (paso 1b) poseen un dominio directriz al estroma y un dominio de transferencia tilacoide en su extremo N. Las proteínas estromales permanecen en el estroma (paso 2) después de la translocación a través de la envoltura exterior y la eliminación de su única secuencia directriz. La presencia del dominio de transferencia tilacoide hace que las proteínas tilacoides se trasladen a la membrana tilacoide o la crucen del todo (paso 3). Varias de las proteínas de la membrana tilacoide se codifican en genes del cloroplasto y se sintetizan en los ribosomas del cloroplasto que están unidos a la superficie exterior de la membrana tilacoide (paso 4).

Captación de proteínas en los cloroplastos

Los cloroplastos poseen seis compartimientos a los que pueden llegar las proteínas: membranas de envoltura interna y externa, espacio intermembranoso, estroma, membrana tilacoide y luz del tilacoide (fig. 8-48). Los mecanismos de importación del cloroplasto y la mitocondria tienen muchas similitudes, aunque sus mecanismos de translocación evolucionaron de manera independiente. Como sucede en la mitocondria:

1. La gran mayoría de las proteínas de los cloroplastos se importa del citosol.
2. Las membranas de envoltura externa e interna contienen distintos complejos de translocación (*complejos Toc* y *Tic*, respectivamente) que funcionan de manera conjunta durante la importación.
3. Las moléculas chaperonas ayudan a desplegar los polipéptidos en el citosol y plegar las proteínas en el cloroplasto.
4. Las proteínas destinadas al cloroplasto se sintetizan con una secuencia terminal N removible (llamada *péptido de tránsito*).

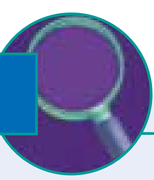
El péptido de tránsito hace algo más que sólo dirigir a un polipéptido al cloroplasto: le proporciona un "domicilio" que localiza al polipéptido en uno de varios posibles compartimientos dentro del organelo (fig. 8-48). Todas las proteínas que pasan por la envoltura del cloroplasto contienen un *dominio de dirección estromal* como parte de su péptido de tránsito que garantiza que el polipéptido ingrese al estroma. Una vez en el estroma, se retira el dominio directriz del estroma mediante una peptidasa procesadora que se localiza en ese compartimiento. Los polipéptidos que pertenecen a la membrana tilacoide o a la luz tilacoide poseen un segmento adicional en el péptido de tránsito,

el *dominio de transferencia tilacoide*, que determina la entrada al tilacoide. Se han identificado distintas vías y a través de ellas las proteínas se insertan en la membrana tilacoide o se trasladan a la luz tilacoide. Estas vías muestran similitudes llamativas con los sistemas de transporte de las células bacterianas, los supuestos ancestros de los cloroplastos. Muchas de las proteínas que residen dentro de la membrana tilacoide se codifican en genes del cloroplasto y se sintetizan en ribosomas unidos a la membrana del cloroplasto, como se ilustra en el paso 4 de la figura 8-48.

REVISIÓN ?

1. ¿De qué forma las proteínas, como las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico, pueden llegar a la matriz mitocondrial?
2. ¿Cuál es el papel de las chaperonas citosólicas y mitocondriales en el proceso de importación mitocondrial?
3. Distinga entre dos posibles mecanismos de importación: difusión tendenciosa y motores generadores de fuerza.
4. Describa los pasos por los cuales un polipéptido se movería del citosol, donde se sintetiza, a la luz tilacoide.

VÍAS EXPERIMENTALES



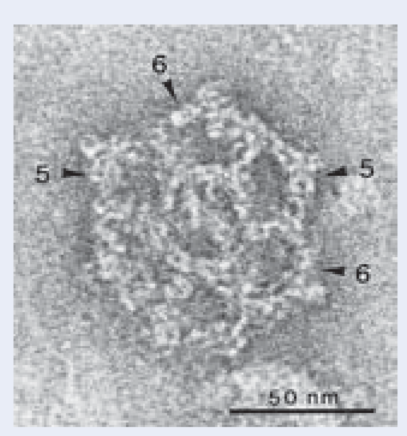
Endocitosis mediada por receptor

El desarrollo embrionario comienza con la fusión de un espermatozoide minúsculo y un óvulo mucho mayor. Los óvulos se desarrollan a partir de los oocitos, los cuales acumulan el vitelo que se sintetiza en otra parte del cuerpo de la mujer. ¿Cómo pueden ingresar las proteínas vitelinas de alto peso molecular en el oocito? En 1964, Thomas Roth y Keith Porter de la *Harvard University* informaron sobre el mecanismo por el cual las proteínas vitelinas podrían penetrar en los oocitos de mosquitos.[1] Advirtieron que durante las etapas de crecimiento rápido del oocito había un aumento notable del número de depresiones parecidas a fosos en la superficie del oocito. Los fosos, que se formaban por la invaginación de la membrana plasmática, estaban cubiertos en su superficie interna por una cubierta erizada. En una proposición visionaria, Roth y Porter postularon que las proteínas vitelinas se adsorbían de manera específica en la superficie externa de la membrana de los fosos cubiertos y que luego se invaginaban como vesículas cubiertas. Las vesículas cubiertas perderían su cubierta erizada y se fusionarían entre sí para producir los cuerpos vitelinos grandes y delimitados por membrana característicos del oocito maduro.

La primera noción de la estructura de las vesículas cubiertas la obtuvieron Toku Kanaseki y Ken Kadota de la *Universidad de Osaka* en 1969.[2] El estudio con microscopio electrónico de una fracción vesicular burda aislada de cerebros de cerdos de Guinea mostró que las vesículas cubiertas estaban revestidas por una red poligonal (fig. 1). Estos investigadores sugirieron que las cubiertas eran un aparato para controlar el desdoblamiento de la membrana plasmática durante la formación de la vesícula.

Los primeros estudios sobre la naturaleza bioquímica de la cubierta vesicular se publicaron en 1975 a cargo de Barbara Pearse del *Medical Research Council* en Cambridge, Inglaterra.[3] Pearse desarrolló un procedimiento en el que las vesículas de membrana de cerebros de cerdo se centrifugaban a través de una sucesión de gradientes de densidad de sacarosa hasta obtener una fracción purificada de vesículas cubiertas. La proteína de las vesículas cubiertas se solubilizó y fraccionó mediante electroforesis en SDS-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, sección 18.7). Los resultados indicaron que la cubierta contenía una especie predominante de proteína con una masa molecular cercana a 180 000 Da. Pearse denominó clatrina a esta proteína. La investigadora encontró la misma proteína (basada en la masa molecular y el mapeo peptídico) en preparaciones de vesículas cubiertas que se habían aislado de varios tipos distintos de células obtenidas de más de una especie animal.[4]

(a)



(b)

FIGURA 1 *a)* Un modelo hecho a mano de una "canasta vacía" que formaría la celosía superficial de una vesícula cubierta. *b)* Micrografía electrónica de alto poder de una canasta proteinácea vacía. Los números 5 y 6 se refieren a elementos pentagonales y hexagonales en la malla, respectivamente. (*A-B*, TOMADAS DE TOKU KANASEKI Y KEN KADOTA, J CELL BIOL 42:216, 1969; CON AUTORIZACIÓN DE LOS DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

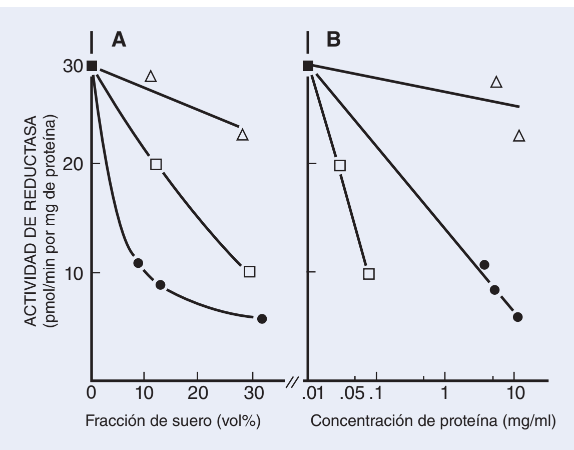


FIGURA 2 La actividad de la reductasa de HMG-CoA en los fibroblastos normales se midió después de la adición de la fracción de lipoproteína de suero de becerro (cuadros vacíos), suero de becerro no fraccionado (círculos llenos) o la fracción no lipoproteína del suero de becerro (triángulos vacíos). Es evidente que las lipoproteínas disminuyen en gran medida la actividad de la enzima, mientras que las no lipoproteínas tienen poco efecto. (Tomada de M. S. Brown et al. Proc Nat'l Acad Sci USA 70:2166, 1973.)

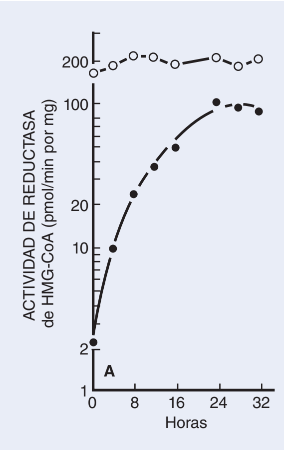


FIGURA 3 Fibroblastos de un sujeto control (círculos llenos) o un paciente con hipercolesterolemia familiar (FH) (círculos vacíos) que se cultivaron en platillos que contenían suero de becerro fetal. En el sexto día (que corresponde a las cero horas en la gráfica) el medio se sustituyó por uno fresco que contenía plasma humano deficiente en lipoproteína. Después del tiempo indicado, se prepararon extractos y se midió la actividad de la reductasa de HMG-CoA. Si se observan las células control, resulta aparente que al principio del periodo de vigilancia las células tienen muy poca actividad enzimática porque el medio contenía tantas lipoproteínas con colesterol que las células no necesitaban sintetizar su propio colesterol. Una vez que se cambió el medio al plasma deficiente en lipoproteína, las células ya no fueron capaces de usar el colesterol del medio, por lo que aumentó la cantidad de enzima en la célula. En cambio, las células de pacientes con FH no mostraron respuesta a la presencia o ausencia de lipoproteínas en el medio. (Tomada de J. L. Goldstein y M. S. Brown, Proc Nat'l Acad Sci USA 70:2805, 1973.)

Mientras se realizaba el estudio descrito, al parecer una línea de investigación independiente comenzó en 1973 en los laboratorios de Michael Brown y Joseph Goldstein de la *University of Texas Medical School* en Dallas. Brown y Goldstein se habían interesado en el trastorno hereditario *hipercolesterolemia familiar*. Las personas homocigóticas para el gen defectuoso (el alelo *FH*), que tenían niveles muy altos de colesterol sérico (800 mg/100 ml contra 200 mg/100 ml de las personas normales) y siempre desarrollaban bloqueos arteriales graves (ateroescleróticos), por lo general morían por infarto cardiaco antes de los 20 años de edad. En ese momento se sabía muy poco acerca de los defectos fisiológicos o bioquímicos fundamentales de este trastorno.

Brown y Goldstein empezaron sus estudios de la hipercolesterolemia familiar con el examen del metabolismo del colesterol en fibroblastos cultivados obtenidos de la piel de individuos normales y pacientes con el trastorno. Encontraron que la enzima que controla la velocidad de la biosíntesis del colesterol, la reductasa de HMG-CoA, podía inhibirse en los fibroblastos normales con la adición de lipoproteínas que contenían colesterol (como la LDL) al medio (fig. 2).[5] Por lo tanto, la adición de LDL al medio de cultivo en el que crecían fibroblastos normales redujo la actividad de la reductasa de HMG-CoA, con el descenso correspondiente de la síntesis de colesterol en los fibroblastos. Cuando se midieron los niveles de reductasa de HMG-CoA en los fibroblastos provenientes de personas con hipercolesterolemia familiar, se halló que eran 40 a 60 veces más altos que en los fibroblastos normales.[6] Además, la actividad enzimática de los fibroblastos con el trastorno no se modificaba por la presencia de LDL en el medio de cultivo (fig. 3).

¿De qué forma las lipoproteínas en el medio afectan la actividad de una enzima en el citoplasma de células cultivadas? Para responder esta pregunta, Brown y Goldstein iniciaron estudios sobre la interacción entre las células y las lipoproteínas. Agregaron LDL con marca radiactiva a las cajas de cultivo que tenían una sola capa de fibroblastos derivados de sujetos con hipercolesterolemia familiar o personas normales.[7] Los fibroblastos normales captaban las moléculas marcadas de LDL con gran afinidad y especificidad, pero las células mutantes eran incapaces de unirse con estas moléculas de lipoproteína (fig. 4). Estos resultados indicaron que las células normales tienen un receptor muy

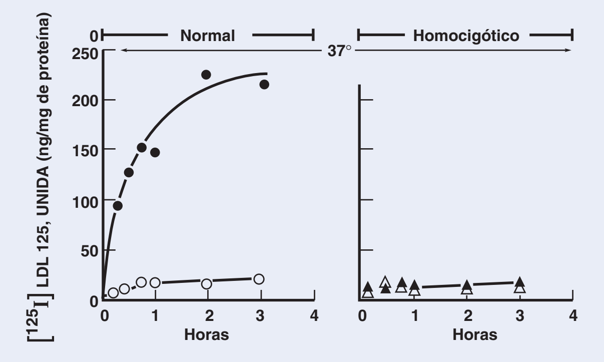


FIGURA 4 Transcurso del tiempo de la unión de LDL marcada con ^{125}I a las células de un sujeto normal (círculos) y a un homocigótico con FH (triángulos) a 37°C. Las células se incubaron en un medio amortiguador que contenía 5 mg/ml de LDL-^{125}I en presencia (círculos y triángulos vacíos) y ausencia (círculos y triángulos llenos) de 250 mg/ml de LDL no radiactiva. Es evidente que en ausencia de LDL no radiactiva adicional, las células normales se unen con cantidades significativas de LDL marcada, pero las células de pacientes con FH no. La unión de LDL marcada disminuye en grado notorio en presencia de LDL no radiactiva porque las lipoproteínas no marcadas compiten con las marcadas por los sitios de unión. Por lo tanto, la unión de la lipoproteína con las células es específica (no es resultado de algún fenómeno de unión inespecífica). (Tomada de M. S. Brown y J. L. Goldstein, Proc Nat'l Acad Sci USA 71:790, 1974.)

específico para LDL y que este receptor es defectuoso o inexistente en las células de pacientes con hipercolesterolemia familiar.

Para visualizar el proceso de unión e interiorización del receptor, Brown y Goldstein formaron un equipo con Richard Anderson, quien había estudiado la estructura celular con el microscopio electrónico. El grupo incubó fibroblastos de personas normales y con hipercolesterolemia familiar junto con LDL que se había unido mediante enlace covalente con la ferritina, proteína que contiene hierro. A causa de los átomos de hierro, las moléculas de ferritina pueden dispersar un haz de electrones y así se pueden visualizar en el microscopio electrónico. Cuando los fibroblastos normales se incubaron con ferritina-LDL a 4°C, una temperatura en la que los ligandos pueden unirse con la superficie celular, pero no pueden interiorizarse, las partículas de LDL-ferritina se vieron unidas a la superficie celular. Un examen minucioso reveló que las partículas de LDL no estaban diseminadas al azar sobre la superficie celular, sino localizadas en segmentos cortos de la membrana plasmática en los que la membrana se invaginaba y estaba cubierta con un material "difuso" (fig. 5).[8] Estos segmentos de la membrana eran similares a los fosos cubiertos descritos al principio por Roth y Porter y desde entonces se han visto en diversos tipos celulares. Aunque las células de los pacientes con FH tienen un número similar de fosos cubiertos en su superficie, ninguna partícula de LDL-ferritina se unió con estas células mutantes. Los resultados apoyaron la proposición de que el alelo mutante para la hipercolesterolemia familiar codifica un receptor incapaz de unirse con LDL. Los estudios siguientes con microscopia electrónica sobre la interiorización de LDL-ferritina revelaron la vía endocítica por la cual se interiorizan estas partículas de lipoproteína, como se describe en el texto del capítulo.[9]

Con base en estos resultados, el grupo postuló que la interiorización rápida de la LDL unida al receptor depende de la localización de los receptores para LDL en los fosos cubiertos. A partir de este postulado, se infiere que si un receptor para LDL no se localiza dentro de un foso cubierto, sería incapaz de entregar su ligando unido a los lisosomas celulares y, por lo tanto, sería imposible que influyera en la biosíntesis de colesterol dentro de la célula. Más o menos en esa época se descubrió un receptor para LDL con un tipo diferente de mutación. Los receptores para LDL que tienen este nuevo defecto (conocido como la mutación J. D. por el paciente en el que se encontró) se unen con cantidades normales de LDL marcada con radiactividad, pero la lipoproteína unida con el receptor no se interiorizó y, por consiguiente, no llegó a los lisosomas citoplásmicos para el procesamiento.[10] Anderson y colaboradores postularon que el receptor LDL era una proteína transmembranosa que en condiciones normales se localiza en los fosos cubiertos porque su dominio citoplásmico se une de manera específica con un componente de los fosos cubiertos, tal vez la clatrina (pero más tarde se identificó como una subunidad probable de un adaptador AP, como se explica más adelante). A causa de un defecto en este dominio citoplásmico, el receptor mutante J. D. fue incapaz de localizarse en los fosos cubiertos de la célula. Las personas con esta mutación tienen el mismo fenotipo que los individuos cuyos receptores son incapaces de unirse con la lipoproteína de baja densidad.

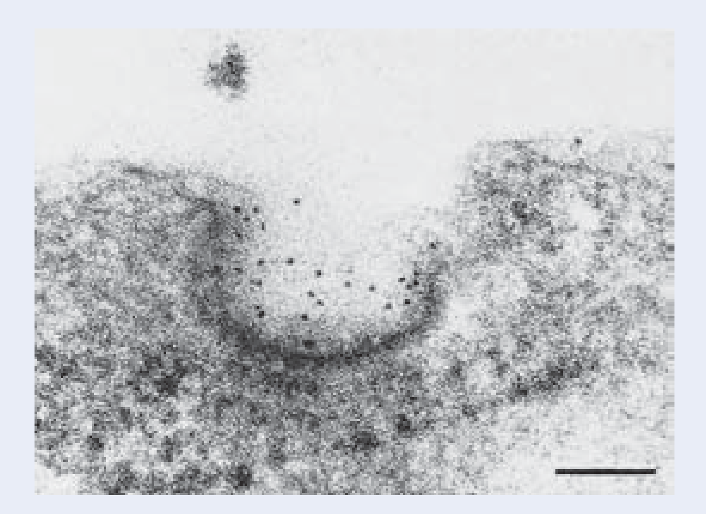


FIGURA 5 Micrografía electrónica que muestra la unión de LDL con los fosos cubiertos de fibroblastos humanos. La LDL se hizo visible al conjugar las partículas con ferritina que contenía hierro electrodenso. (Tomada de R. G. W. Anderson, M. S. Brown y J. L. Goldstein, Cell 10:356, 1977. Con autorización de Cell Press.)

Los estudios subsecuentes determinaron que el receptor normal para LDL es una glucoproteína transmembranosa de 839 aminoácidos y los 50 aminoácidos del extremo C se extienden hacia dentro a partir de la membrana como dominio citoplásmico. El análisis del receptor mutante J. D. reveló que la proteína contenía una sola sustitución de aminoácidos: un residuo de tirosina que en condiciones normales se localiza en la posición 807 se cambió por una cisteína.[11] Esta sola alteración en la secuencia de aminoácidos eliminó la capacidad de la proteína para concentrarse en los fosos cubiertos.

En los años siguientes, la atención se desvió hacia las secuencias de aminoácidos de las colas citoplásmicas de otros receptores que se localizan en los fosos cubiertos. ¿Existía una señal común de interiorización? Los estudios con diversos receptores de membrana mostraron dos de estas señales, ambas con tirosina (Y, en la nomenclatura de una sola letra): una señal menos frecuente, NPXY (como en el receptor para LDL) y una señal más frecuente YXXϕ (como en el receptor para transferrina). En la señal YXXϕ, X puede ser cualquier aminoácido y ϕ es un aminoácido con una cadena lateral voluminosa e hidrófoba. La secuencia YXXϕ del receptor se une con la subunidad μ de los adaptadores AP2 (fig. 8-40).[12] Los estudios cristalográficos con rayos X revelaron la naturaleza de la interacción entre el adaptador y la señal de interiorización.[13] Dentro de la subunidad μ hay dos sacos hidrófobos, uno que se une con el residuo de tirosina y el otro con la cadena lateral hidrófoba voluminosa de la señal de interiorización. Mientras tanto, el complejo adaptador AP2 se une con la cubierta de clatrina mediante su subunidad beta (fig. 8-40). Como resultado de estos diversos contactos intermoleculares, el complejo adaptador y el receptor quedan atrapados en los fosos cubiertos antes de la endocitosis.[14]

En la última década se siguieron distintas líneas de investigación, muchas de éstas sobre la endocitosis mediada por clatrina. Uno de los enfoques experimentales más fructíferos ha sido marcar dos o más componentes de la maquinaria endocítica con diferentes colorantes fluorescentes y seguir sus movimientos en el tiempo dentro de una célula viva. Usando este método, los investigadores han observado dinamina, adaptadores AP2 o diferentes tipos de receptores de carga unidos a fosetas cubiertas de clatrina para ser envueltos por una vesícula cubierta de clatrina, que entonces se desprende en el citoplasma y desaparece. En la figura 6 se describe un ejemplo de este tipo de experimento.[15] Las micrografías de fluorescencia muestran la superficie de una célula epitelial de mamífero cultivada que expresa una cadena ligera de clatrina fusionada a una variante de la proteína fluorescente verde. Las zonas verdes representan en mayor medida fosetas cubiertas situadas en la superficie celular. Los puntos que se tiñen de rojo son partículas de LDL individuales marcadas con fluorescencia que se agregaron al medio de cultivo de las células. La serie de imágenes ilustra una foseta cubierta de clatrina individual (indicada por las flechas verdes en los primeros cuadros rotulados T_1) que ha capturado una partícula de LDL específica (indicada por las flechas rojas en estos mismos cuadros iniciales). Una vez que la partícula de LDL se ha unido a un receptor de LDL en la foseta cubierta, la superposición de los dos colorantes fluorescentes produce una mancha amarillo-anaranjada (indicada por las flechas amarillas en los cuadros rotulados T_2 y T_3).

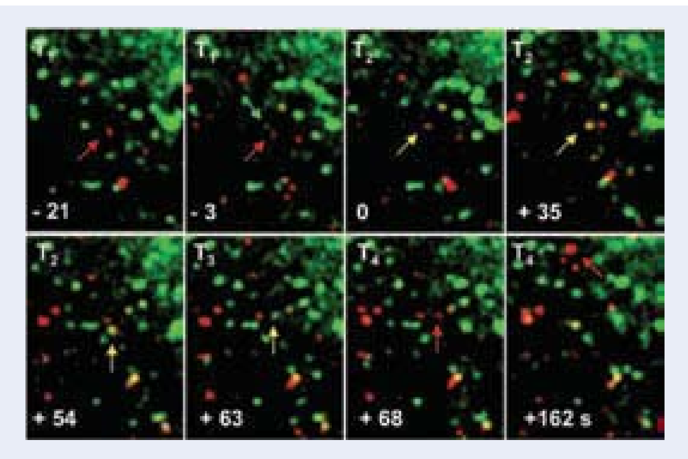


FIGURA 6 Serie de imágenes de fluorescencia que muestran la captura de una partícula de LDL con fluorescencia roja por una foseta cubierta de clatrina (con fluorescencia verde) y su incorporación en una vesícula cubierta de clatrina, la cual pierde la cubierta y se mueve al citoplasma. Los procesos se describen en el texto. T_1 a T_4 son los intervalos antes de la fijación (T_1) y durante ella (T_2), el movimiento lateral conjunto de LDL y clatrina antes del descubrimiento (T_3) y el movimiento de LDL después del descubrimiento (T_4), respectivamente. Los tiempos indicados están en segundos en cada cuadro, donde 0 corresponde al instante en que LDL y clatrina se unen. (Tomada de Marcelo Ehrlich, et al., cortesía de Tomas Kirchhausen, Cell 118:597, 2004; con autorización de Cell Press.)

Los cuadros restantes (rotulados T_4) muestran la vesícula descubierta que contiene la partícula de LDL con fluorescencia roja moviéndose hacia el citoplasma adyacente.

Referencias

1. Roth, T. F. & Porter, K. R. 1964. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti. J. Cell Biol.* 20:313–332.
2. Kanaseki, T. & Kadota, K. 1969. The "vesicle in a basket." *J. Cell Biol.* 42:202–220.
3. Pearse, B. M. F. 1975. Coated vesicles from pig brain: Purification and biochemical characterization. *J. Mol. Biol.* 97:93–96.
4. Pearse, B. M. F. 1976. Clathrin: A unique protein associated with the intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 73:1255–1259.
5. Brown, M. S., Dana, S. E., & Goldstein, J. L. 1973. Regulation of HMG CoA reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 70:2162–2166.
6. Goldstein, J. L. & Brown, M. S. 1973. Familial hypercholesterolemia: Identification of a defect in the regulation of HMG CoA reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 70:2804–2808.
7. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. 1974. Familial hypercholesterolemia: Defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of HMG CoA reductase activity. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 71:788–792.
8. Anderson, R. G. W., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. 1976. Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 73:2434–2438.
9. Anderson, R. G. W., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. 1977. Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* 10:351–364.
10. Anderson, R. G. W., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. 1977. A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localise in coated pits on the cell surface of human fibroblasts. *Nature* 270:695–699.
11. Davis, C. G., et al. 1986. The J. D. mutation in familial hypercholesterolemia: Amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell* 45:15–24.
12. Ohno, H., et al. 1995. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* 269:1872–1874.
13. Owen, D. J. & Evans, P. R. 1998. A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytic signals. *Science* 282:1327–1332.
14. M. A. Edeling, et al. 2006. Life of a clathrin coat. *Nat. Revs. Mol. Cell Biol.* 7:32-44.
15. Ehrlich, M., et al. 2004. Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* 118:591–605.

SINOPSIS

El citoplasma de las células eucariotas contiene un sistema de organelos membranosos, incluidos el retículo endoplásmico, aparato de Golgi y lisosoma, que establecen una relación funcional y estructural entre ellos y con la membrana plasmática. Estos diversos organelos membranosos son parte de una dinámica red integrada de endomembrana en la que los materiales van y vienen como parte de vesículas de transporte que se forman al desprenderse de un compartimiento y fusionarse con otro. Una vía biosintética (secretora) mueve proteínas de su sitio de síntesis en el ER a través del aparato de Golgi hasta su destino final (un organelo, la membrana plasmática o el espacio extracelular), mientras que una vía endocítica desplaza material en sentido contrario, de la membrana plasmática o espacio extracelular al interior de la célula. El cargamento se dirige a su destino apropiado mediante señales específicas que son parte de las proteínas mismas (pág. 275).

El retículo endoplásmico (ER) es un sistema de túbulos, cisternas y vesículas que divide el citoplasma en un espacio luminal dentro de las membranas del ER y un espacio citosólico fuera de las membranas. El ER se divide en dos grandes tipos: el ER rugoso (RER), que está formado por cisternas aplanadas y cuyas membranas tienen ribosomas unidos, y el ER liso (SER), que se compone sobre todo de compartimientos tubulares y cuyas membranas carecen de ribosomas. Las funciones del SER varían de una célula a otra e incluyen la síntesis de hormonas esteroideas, desintoxicación de una amplia variedad de compuestos orgánicos y secuestro de iones calcio. Las funciones del RER incluyen síntesis de las proteínas que se secretan después, proteínas lisosómicas y proteínas integrales de membrana (pág. 282).

Las proteínas que se sintetizan en los ribosomas unidos con la membrana del RER se reconocen por una secuencia de señal hidrófoba, que casi siempre se sitúa cerca del extremo N del polipéptido naciente. Conforme la secuencia de señal surge del ribosoma, se le une una partícula de señal de reconocimiento (SRP) que detiene la síntesis y media la unión del complejo a la membrana del RER. Después de la unión, la SRP se libera de la membrana y el polipéptido

naciente pasa por un poro recubierto con proteína en la membrana del ER hacia la luz de éste. Las proteínas lisosómicas y secretoras se trasladan completas hacia la luz, mientras que las proteínas de membrana se incluyen en la bicapa lipídica gracias a una o más secuencias transmembranosas hidrófobas. Las proteínas que no se pliegan en forma correcta se trasladan de regreso al citosol y se destruyen. Una vez que una proteína nueva se sitúa en la luz o la membrana del RER, puede moverse de ese sitio a destinos específicos de la vía biosintética. Si la luz del ER se "atraganta" por la abundancia excesiva de las proteínas recién sintetizadas, una respuesta integral llamada respuesta a proteínas desplegadas detiene la síntesis de las proteínas en el ER y fomenta la eliminación de las que ya están presentes (pág. 286).

La mayor parte de los lípidos de las membranas celulares también se sintetiza en el ER y se traslada de ese sitio a varios destinos. Los fosfolípidos se sintetizan en la cara citosólica del ER y se insertan en la hoja externa de la membrana del ER. Algunas de estas moléculas después giran hacia la hoja contraria. La composición de lípidos de las membranas se modifica de varias maneras. Por ejemplo, los fosfolípidos pueden transportarse en forma selectiva de la membrana de un organelo a otro, o los grupos cabeza de lípidos específicos pueden modificarse por medios enzimáticos (pág. 288).

La adición de azúcares (glucosilación) a los residuos de asparagina de las proteínas inicia en el ER rugoso y continúa en el aparato de Golgi. Las secuencias de los azúcares que constituyen las cadenas de oligosacáridos de las glucoproteínas se determinan por los tipos y localizaciones de los miembros de una gran familia de glucosiltransferasas, enzimas que transfieren un azúcar específico de un azúcar de nucleótido donante a un receptor específico. Las cadenas de carbohidrato se ensamblan en el ER, un azúcar a la vez, y luego se transfieren como unidad del portador dolicol a un residuo de asparagina del polipéptido. Casi tan pronto como se transfiere el bloque de carbohidrato, empieza a modificarse, primero por la eliminación de los residuos terminales de glucosa. Las vesículas de membrana, con su cargamento dentro, se desprenden de los bordes del ER y se dirigen al aparato de Golgi (pág. 290).

El aparato de Golgi funciona como una planta procesadora, modifica los componentes de la membrana y el cargamento sintetizado en el ER antes de desplazarse a su destino final. El aparato de Golgi también es el sitio de síntesis de los polisacáridos complejos que forman la matriz de la pared celular de los vegetales. Cada aparato de Golgi consiste en una pila de cisternas aplanadas parecidas a platos, con bordes dilatados, vesículas y túbulos relacionados. Los materiales entran a la pila por la cara *cis* y se modifican conforme se mueven por transporte vesicular hacia la cara contraria, o *trans*. Mientras atraviesan la pila, se agregan azúcares a las cadenas de oligosacáridos por acción de las glucosiltransferasas localizadas en cisternas de Golgi particulares. Cuando las proteínas llegan a la red *trans* de Golgi (TGN) al final de la pila, están listas para clasificarse y dirigirse a su destino celular o extracelular final (pág. 293).

La mayoría, si no es que todas las vesículas que transportan materiales por el sistema de endomembrana, se encierra al principio en una cubierta proteica. Se han identificado varios tipos de vesículas cubiertas. Las vesículas cubiertas con COP-II transportan materiales del ER al aparato de Golgi. Las vesículas cubiertas con COP-I trasladan materiales en el sentido contrario (retrógrado), del aparato de Golgi al ER. Las vesículas cubiertas con clatrina llevan materiales de la TGN a los endosomas, lisosomas y vacuola central (en las plantas). Las vesículas cubiertas con clatrina también forman parte de la vía endocítica, trasladan materiales de la membrana plasmática a los endosomas y lisosomas (pág. 298).

Cada compartimiento de la vía biosintética o endocítica tiene una composición proteica característica. Las proteínas residentes tienden a ser retenidas en ese compartimiento particular y se recuperan si escapan a otros compartimientos. La mayor parte de la clasificación de proteínas en la vía biosintética ocurre en los últimos compartimientos de Golgi, la TGN. La TGN es la fuente de las vesículas que contiene proteínas de membrana particulares que dirigen la vesícula hacia un destino particular. Las enzimas lisosómicas producidas en el ER rugoso se separan en la TGN y se dirigen a los lisosomas en vesículas cubiertas con clatrina. Las enzimas lisosómicas están encerradas en estas vesículas desprendidas porque tienen residuos de manosa fosforilada en sus oligosacáridos centrales. Receptores de membrana (MPR) reconocen estos oligosacáridos modificados. A su vez, los receptores están unidos con una clase de adaptadores (proteínas GGA) que forman una capa entre la cubierta externa de clatrina y la membrana de la vesícula (pág. 300).

Las vesículas que se desprenden de un compartimiento donante poseen proteínas específicas en su membrana que reconocen a las proteínas localizadas en el compartimiento blanco (receptor). El acoplamiento de dos membranas está mediado por proteínas de fijación y regulado por una gran familia de proteínas G llamadas Rab. SNARE-v y SNARE-t median la fusión de las membranas donante y receptora e interactúan para formar haces de cuatro cadenas (pág. 304).

Los lisosomas son organelos limitados por membrana de apariencia diversa que contienen conjuntos de hidrolasas ácidas capaces de digerir cualquier tipo de macromolécula biológica. Entre sus numerosas funciones, los lisosomas degradan materiales, como bacterias y detritos, que llegan a la célula por fagocitosis, degradan los organelos citoplásmicos viejos mediante un proceso llamado autofagia y digieren diversas macromoléculas que se liberan mediante endosomas por endocitosis mediada por receptor. En los vertebrados, los lisosomas tienen un papel clave en la defensa inmunitaria (pág. 307).

Las vacuolas de las plantas realizan actividades diversas. Las vacuolas sirven como almacén temporal para los solutos y macromoléculas; contienen compuestos tóxicos que se emplean en la defensa; suministran un contenedor para los desechos celulares; mantienen un compartimiento hipertónico que ejerce la presión de turgencia contra la pared celular, y son el sitio para la digestión intracelular mediada por hidrolasas ácidas (pág. 310).

La endocitosis facilita la captación de líquido y macromoléculas suspendidas, la interiorización de los receptores de membrana y sus ligandos unidos y además participa en el reciclaje de la membrana entre la superficie celular y el citoplasma. La fagocitosis es la captación de materia en partículas. En la endocitosis mediada por receptor, ligandos específicos se unen con los receptores de la membrana plasmática. Los receptores se reúnen en fosos de la membrana que están cubiertos por su cara citoplásmica con un soporte poligonal de moléculas de clatrina. Las fosetas cubiertas dan origen a vesículas cubiertas, que pierden su cubierta y entregan su contenido a un endosoma y, al final, a un lisosoma. La fagocitosis puede funcionar como mecanismo de alimentación o sistema de defensa celular (pág. 311).

Las proteínas dentro de los peroxisomas, mitocondrias o cloroplastos que están codificadas en genes nucleares deben importarse al organelo después de la traducción. En todos estos casos, las proteínas que deben importarse contienen secuencias de señal que interactúan con los receptores encargados de la importación de proteínas. Estos tres organelos tienen canales recubiertos con proteína en sus membranas que promueven la translocación de polipéptidos plegados (en los peroxisomas) o polipéptidos desdoblados (en las mitocondrias y cloroplastos) al interior del organelo. Las mitocondrias y los cloroplastos contienen varios compartimientos diferentes a donde se dirigen las proteínas nuevas recién trasladadas (pág. 318).

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. ¿Cuál (si lo hay) de los polipéptidos siguientes se esperaría que careciera de péptido de señal: colágena, fosfatasa ácida, hemoglobina, proteínas ribosómicas, glucoforina, proteínas del tonoplasto?
2. Supóngase que sospecha que un paciente podría sufrir enfermedad de células I (pág. 309). ¿Cómo confirmaría que el diagnóstico es preciso con células cultivadas de ese paciente?
3. ¿En qué compartimiento celular se esperaría que una glucoproteína tuviera el mayor contenido de manosa, *N*-acetilglucosamina y ácido siálico?
4. En la página 318 se indicó que los peroxisomas son capaces de importar proteínas plegadas. Sin embargo, estos organelos son impermeables a moléculas relativamente pequeñas, como NADH y acetil-CoA. ¿Cómo es posible que sea permeable a unas y no a otras?
5. ¿Cuáles son las dos proteínas que esperaría encontrar como componentes integrales de la membrana del RER y que estarían ausentes de la membrana del SER?, ¿cuáles son dos de las proteínas del SER que no existen en el ER rugoso?
6. Si se desea estudiar el proceso de secreción regulada en una célula que carece de gránulos secretores maduros, esto es, vesículas que contienen material secretor que ya está listo para exportarse, ¿cómo podría obtenerse una célula que no tuviera tales gránulos?
7. En la página 310 se describió cómo podría prepararse glucocerebrosidasa que tuviera residuos de manosa en el extremo de sus oligosacáridos superficiales y no en el azúcar usual, el ácido siálico. Una versión similar de la glucocerebrosidasa con residuos de manosa expuestos está en proceso de producción mediante tecnología de DNA recombinante con una línea especial de células. ¿Qué características cree que pudieran tener estas células? Un indicio: la información para responder esta pregunta está en la figura 8-22.
8. La autorradiografía depende de partículas emitidas por átomos radiactivos que golpean una emulsión fotográfica que se encuentra sobre el corte hístico. Cuando se desarrolla la emulsión, el sitio en el que la partícula golpeó la emulsión aparece como un grano plateado, como en la figura 8-3*a*. ¿Cómo cree que afectaría el grosor del corte a la resolución de la técnica, esto es, la capacidad para localizar el sitio preciso en la célula en el que se incorporó la radiactividad?
9. ¿En qué parte de la célula esperaría que se incorporaran primero los compuestos siguientes: [^{3}H] leucina, [^{3}H] ácido siálico, [^{3}H] manosa, [^{3}H] colina, [^{3}H] ácido glucurónico (precursor de los GAG), [^{3}H] pregnenolona (precursor de hormonas esteroideas), [^{3}H] ramnosa en una célula vegetal (la ramnosa es precursora de las pectinas)?
10. ¿Cuál de las células siguientes esperaría que participara en forma más activa en la endocitosis por volumen: a) un eritrocito, b) una célula acinar pancreática, c) una célula de músculo esquelético?, ¿por qué?
11. ¿Esperaría que las propiedades del lado de la cisterna de las membranas de Golgi fueran más parecidas al lado extracelular o al citosólico de la membrana plasmática?, ¿por qué?
12. ¿Qué compartimiento(s) de una célula se relaciona(n) con cada uno de los siguientes: clatrina, iones calcio en una célula de músculo esquelético, fosfato de dolicol, ribonucleasa y lipasa, digital, receptores para LDL, proteínas COP-I, proteínas COP-II, SRP no unidas?
13. Si un corte de tejido pancreático se incubara en [^{3}H] leucina en forma continua durante dos horas, ¿en qué parte de las células acinares esperaría encontrar la radiactividad incorporada?
14. Si agregara un fármaco que interfiere con la capacidad de los ribosomas para unirse con mRNA, ¿qué efecto esperaría que tuviera en la estructura del ER rugoso?
15. No todos los receptores que participan en la endocitosis mediada por receptores se localizan en los fosos cubiertos antes de unirse al ligando, pero se concentran en estos fosos antes de la interiorización ¿Cómo presupone que la unión de un ligando haría que un receptor se concentrara en un foso cubierto?
16. En el texto se indicó que los lisosomas carecen de una apariencia distintiva con un microscopio electrónico. ¿Cómo podría establecer si una vacuola particular es en realidad un lisosoma?
17. Los estudios de un raro trastorno hereditario, la enfermedad de Dent, revelaron que las personas con este padecimiento carecen de un canal para el ion cloro en los endosomas de las células de los túbulos renales. Dichos pacientes sufren diversos síntomas que sugieren que sus compartimientos endosómicos no eran tan ácidos como los de individuos normales. ¿Cómo presupone que un defecto en el canal para el cloro explique esta alteración?
18. Examine la micrografía con fluorescencia de la figura 8-20*c*. Aunque el aparato de Golgi tiene una tinción brillante, existe fluorescencia roja dispersa en otras partes de la célula. ¿Cómo explica la presencia de esta tinción dispersa?

SITIO EN INTERNET www.wiley.com/college/karp

Las animaciones y los videos indicados en este capítulo pueden visitarse en el sitio de Cell and Molecular Biology de Karp en Internet. También hallará todas las respuestas a las preguntas analíticas recién planteadas, autoexámenes que le ayudarán a prepararse para los exámenes, y vínculos con fascinantes recursos. La sección lecturas adicionales que sigue se amplía en el sitio en Internet.

LECTURAS ADICIONALES

Appenzeller-Herzog, C. & Hauri, H.-P. 2006. The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J. Cell Sci.* 119:2173–2183.

Balch, W. E. 2004. Vesicle traffic in vitro. *Cell* S116:S17–19. [perspectiva histórica.]

Bickford, L. C., et al. 2004. A structural view of the COPII vesicle coat. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14:147–153.

Bonifacino, J. S. 2004. The GGA proteins: adaptors on the move. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 5:23–32.

Bonifacino, J. S. & Glick, B. S. 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116:153–166.

Brady, R. O. 2006. Enzyme replacement for lysosomal diseases. *Annu. Rev. Med.* 57:283–296.

De Camilli, P. & De Matteis, M. A. eds. 2006. Membranes and organelles. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, #4.

de Duve, C. 2005. The lysosome turns fifty. *Nature Cell Biol.* 7:847–849.

de Marcos-Lousa, C., et al. 2006. Translocation of mitochondrial inner-membrane proteins: conformation matters. *Trends Biochem. Sci.* 31:259–267.

Engelman, D. M., et al. 2005. Reviews on endomembrane biology. *Nature* 438:578–621.

Freeze, H. H. 2006. Genetic defects in the human glycome. *Nature Revs. Gen.* 7:537–552.

Futerman, A. H. & van Meer, G. 2004. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature Revs. Mol. Cell Biol*. 5:554–565.

Hebert, D. N., et al. 2005. The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. *Trends Cell Biol.* 15:364–370.

Holthuis, J. C. M. & Levine, T. P. 2005. Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 6:209–220.

Jahn, R. & Scheller, R. H. 2006. SNAREs—engines for membrane fusion. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 7:631–643.

Jarvis, P. & Robinson, C. 2004. Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Curr. Biol.* 14:R1064–R1077.

Klionsky, D. J. 2006. Good riddance to bad rubbish. *Nature* 441:819–820. [sobre el cometido de la autofagia en la eliminación de agregados proteínicos.]

Linsel-Nitschke, P. & Tall, A. R. 2005. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature Revs. Drug Disc.* 4:193–205.

MacKinnon, R. 2005. Membrane protein insertion and stability. *Science* 307:1425–1426.

Malhotra, V. & Yaffe, M. P., eds. 2005. Membranes and organelles: regulating the size, shape, and plasticity of cellular compartments. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:#4.

Malhotra, V. & Mayor, S. 2006. The Golgi grows up. *Nature* 441:939–940. [modelo de maduración de cisternas.]

Maxfield, F. R. & McGraw, T. E. 2004. Endocytic recycling. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 5:121–132.

Meusser, B., et al. 2005. ERAD: the long road to destruction. *Nature Cell Biol.* 7:766–772.

Munro, S., et al. 2004. Focus on membrane traffic. *Nature Cell Biol.* 6:#6.

Nguyen, L. & Pieters, J. 2005. The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Trends Cell Biol.* 15:269–276.

Osborne, A. R., et al. 2005. Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:529–550.

Pfeffer, S. & Aivazian, D. 2004. Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 5:886–896.

Praefcke, G. J. K. & McMahon, H. T. 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 5:133–147.

Rabouille, C. & Klumperman, J. 2005. The maturing role of COPI vesicles in intra-Golgi transport. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 6:812–817.

Rapoport, T. A., et al. 2004. Membrane-protein integration and the role of the translocation channel. *Trends Cell Biol.* 14:568–575.

Rehling, P., et al. 2004. Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 5:519–530.

Shibata, Y., et al. 2006. Rough sheets and smooth tubules. *Cell* 126:435–439. [sobre el retículo endoplásmico.]

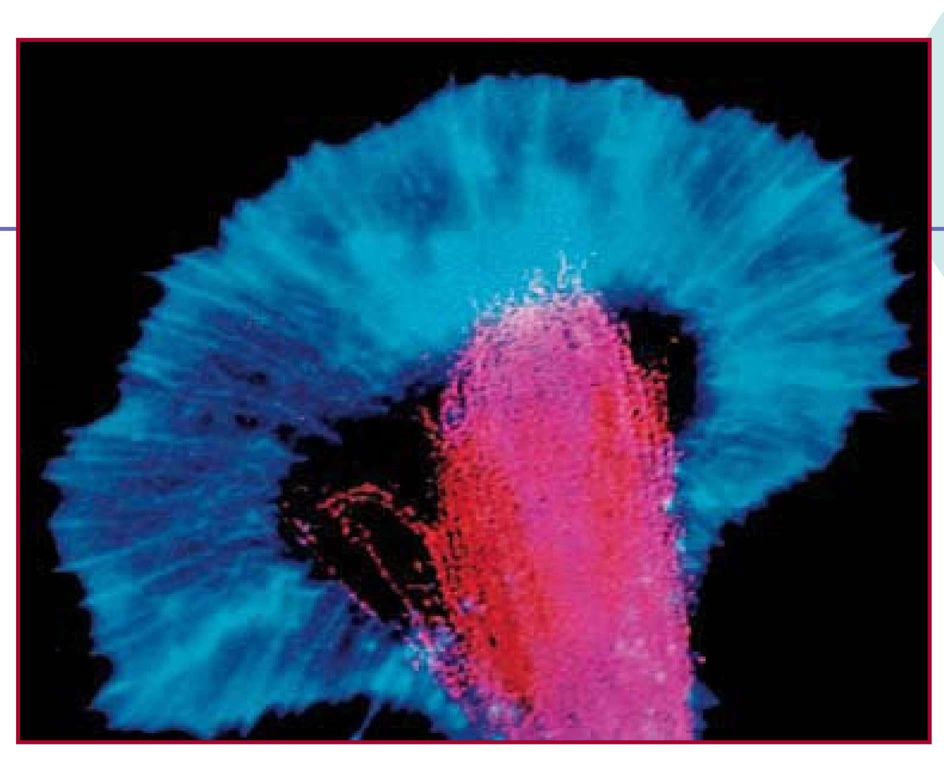
Tu, B. P. & Weissman, J. S. 2004. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J. Cell Biol.* 164:341–346.

Ungermann, C. & Langosch, D. 2005. Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing. *J. Cell Sci.* 118:3819–3828.

White, S. H. & von Heijne, G. 2005. Transmembrane helices before, during, and after insertion. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15:378–386.

Zhang, K. & Kaufman, R. J. 2004. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 279:25935–25938.

CAPÍTULO 9



El citoesqueleto y la motilidad celular

El esqueleto de un vertebrado es un sistema orgánico familiar que consiste en elementos endurecidos que sostienen los tejidos blandos del cuerpo y desempeñan una función clave en los movimientos corporales. Las células eucariotas también poseen un "sistema esquelético", un **citoesqueleto**, que tiene funciones análogas. El citoesqueleto se compone de tres estructuras filamentosas bien definidas: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, que en conjunto constituyen una red interactiva. Cada uno de los tres tipos de filamentos citoesqueléticos es un polímero de subunidades proteicas unidas mediante enlaces débiles no covalentes. Este tipo de construcción se presta a un ensamble y un desensamble rápidos, que dependen de una regulación celular compleja. Cada elemento del citoesqueleto tiene propiedades distintas. Los **microtúbulos** son tubos largos, huecos y sin ramificaciones compuestos por subunidades de la proteína tubulina. Los **microfilamentos** son estructuras sólidas más delgadas, a menudo organizadas en una red ramificada, y formados por la proteína actina. Los filamentos intermedios son fibras resistentes, similares a cuerdas, formadas por diversas proteínas relacionadas. Las propiedades de los microtúbulos, los **filamentos intermedios** y los filamentos de actina se resumen en el cuadro 9-1. Aunque los componentes del citoesqueleto parecen estacionarios en las micrografías, en realidad son estructuras muy dinámicas capaces de reorganizarse en forma drástica. Hasta hace poco se supuso que el citoesqueleto era una innovación exclusiva de los eucariotas y por tanto inexistente en las células procariotas. Ahora se sabe que ciertos procariotas contienen proteínas similares a

Extremo de un axón en crecimiento de una liebre marina Aplysia. *Los filamentos de actina, que son necesarios para las actividades motrices del axón en crecimiento, se muestran en azul; los microtúbulos, que se localizan debajo de la punta en crecimiento, se muestran en rojo. La fotografía es una composición de imágenes de video separadas que se sobrepusieron mediante técnica digital.* (Tomada de P. Forscher y S. J. Smith. J Cell Biol 107:1514, 1988, mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press. Cortesía de Paul Forscher, Yale University.)

Cuadro 9-1 Propiedades de los microtúbulos, los filamentos intermedios y los filamentos de actina

	Microtúbulos	Filamentos intermedios	Filamentos de actina
Subunidades incorporadas en un polímero	Heterodímero GTP-αβ-tubulina	Varias proteínas globulares	Monómeros de ATP-actina
Sitio preferencial de la incorporación	Extremo + (tubulina-β)	Interno	Extremo + (barbado)
Polaridad	Sí	No	Sí
Actividad enzimática	GTP-asa	Ninguna	ATP-asa
Proteínas motoras	Cinesinas, dineínas	Ninguna	Miosinas
Grupo principal de proteínas relacionadas	MAP	Plaquinas	Proteínas de unión con actina
Estructura	Tubo rígido y hueco	Fibras gruesas, similares a cuerdas	Filamento helicoidal flexible
Dimensiones	25 nm de diámetro externo	10 nm de diámetro	8 nm de diámetro
Distribución	Todos los eucariotas	Animales	Todos los eucariotas
Funciones principales	Soporte, transporte intracelular, organización celular	Soporte estructural	Movilidad, contractilidad

la tubulina y la actina que se polimerizan en filamentos citoplásmicos que realizan actividades semejantes a las del citoesqueleto. También se han descubierto en determinados procariotas que existen proteínas lejanamente relacionadas con las de los filamentos intermedios, por lo cual parecería que los tres tipos de elementos del citoesqueleto tienen sus raíces evolutivas en estructuras procariotas. El capítulo comienza con una breve revisión de las principales actividades citoesqueléticas.

9.1 REVISIÓN DE LAS PRINCIPALES FUNCIONES DEL CITOESQUELETO

La figura 9-1 presenta una revisión de las principales actividades del citoesqueleto en tres diferentes células extramusculares. Las células que se muestran en esta ilustración esquemática incluyen una célula epitelial polarizada, la punta de una

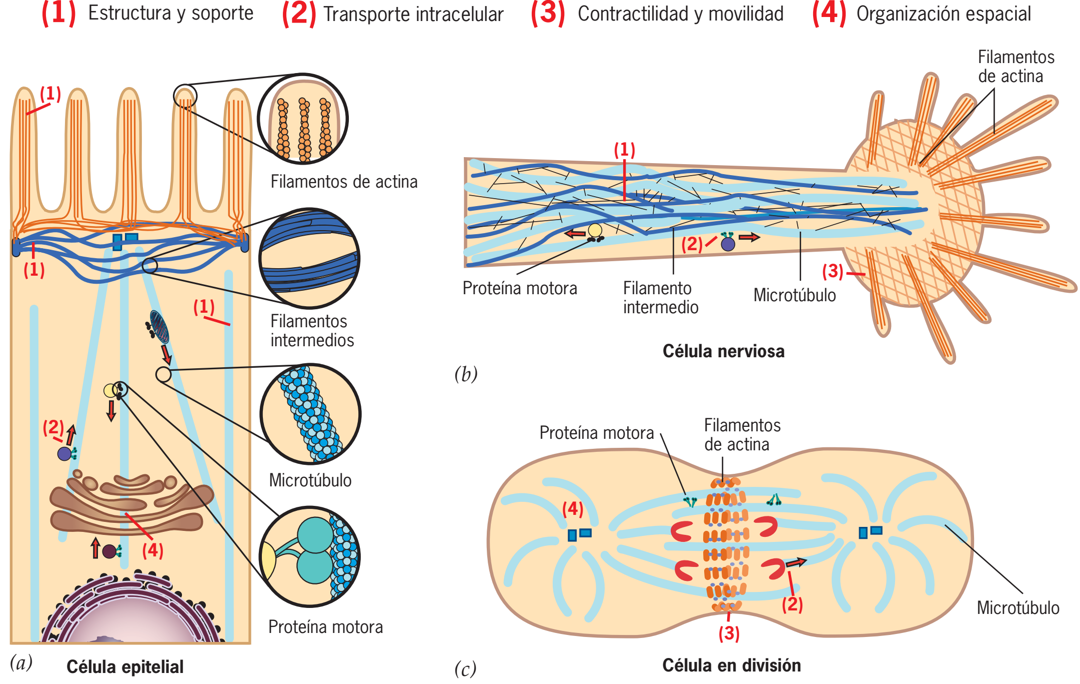


FIGURA 9-1 Revisión de la estructura y funciones del citoesqueleto. Esquemas de *a*) una célula epitelial, *b*) una célula nerviosa y *c*) una célula que se divide. Los microtúbulos de las células epitelial y nerviosa funcionan sobre todo como soporte y en el transporte de organelos, mientras que los microtúbulos de la célula en división forman el huso mitótico necesario para la separación de los cromosomas. Los filamentos intermedios brindan soporte estructural para la célula epitelial y la nerviosa. Los microfilamentos sostienen las microvellosidades de la célula epitelial y son parte integral del sistema móvil participante en la elongación y la división celulares.

célula nerviosa en proceso de elongación y una célula cultivada en fase de división. Como se explica en este capítulo, el citoesqueleto de estas células funciona como:

1. Un andamio dinámico que brinda soporte estructural, el cual puede determinar la forma de la célula y resistir fuerzas que tiendan a deformarla.
2. Un marco interno encargado de establecer las posiciones de los organelos dentro de la célula. Esta función resulta muy evidente en las células epiteliales polarizadas, como las que se muestran en la figura 8-11, en las que ciertos organelos están dispuestos en un orden definido del extremo apical de la célula a la parte basal.
3. Una red de rieles que dirigen el movimiento de materiales y organelos dentro de las células. Los ejemplos de esta función comprenden el traslado de las moléculas de mRNA a partes específicas de una célula, el movimiento de portadores membranosos del retículo endoplásmico al aparato de Golgi y el transporte de vesículas que contienen neurotransmisores a todo lo largo de la célula nerviosa. La figura 9-2 muestra una pequeña porción de una célula cultivada y es evidente que la mayor parte de los organelos verdes fluorescentes, que son peroxisomas (pág. 207), está muy relacionada con los microtúbulos (rojos) del citoesqueleto celular. Los microtúbulos son los rieles sobre los que los peroxisomas se transportan en las células de los mamíferos.
4. El aparato generador de fuerza que mueve las células de un sitio a otro. Los organismos unicelulares se mueven por "arrastramiento" sobre la superficie de un sustrato sólido o al propulsarse por su ambiente acuoso con la ayuda de organelos locomotores especializados que contienen microtúbulos (cilios y flagelos) que sobresalen de la superficie celular. Los animales tienen diversas células con capacidad de locomoción independiente, como los espermatozoides, los leucocitos y los fibroblastos (fig. 9-3). La punta de un axón en crecimiento también tiene una gran movilidad (fig. 9-1) y su movimiento se parece al de una célula sanguínea que "se arrastra".
5. Un componente esencial de la maquinaria para la división celular. Los elementos del citoesqueleto constituyen el aparato que se encarga de separar los cromosomas durante la mitosis y la meiosis, además de dividir la célula madre en dos células hijas durante la citocinesis. Estos fenómenos se describen con detalle en el capítulo 14.

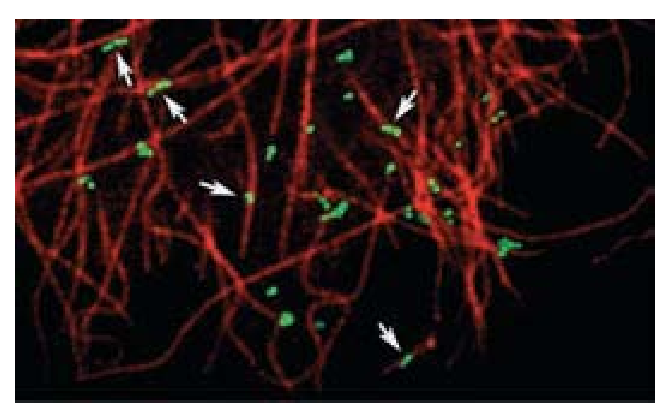


FIGURA 9-2 Un ejemplo de la función de los microtúbulos en el transporte de organelos. Los peroxisomas de esta célula (que se muestran en verde y se señalan con flechas) mantienen una relación cercana con los microtúbulos del citoesqueleto (mostrados en rojo). Los peroxisomas se ven verdes porque contienen la proteína peroxisómica fusionada con la proteína verde fluorescente (pág. 277). Los microtúbulos se ven rojos porque están teñidos con un anticuerpo con marca fluorescente. (Tomada de E. A. C. Wiemer et al., J Cell Biol 136:78, 1997. Por cortesía de S. Subramani, mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

9.2 EL ESTUDIO DEL CITOESQUELETO

El citoesqueleto es uno de los temas que se estudian de manera más activa en la biología celular actual debido, en parte, al desarrollo de técnicas que permiten a los investigadores buscar una estrategia morfológica, bioquímica y molecular coordinada. Como resultado se sabe mucho de las familias de proteínas que conforman el citoesqueleto; cómo se organizan las subunidades en sus estructuras fibrosas respectivas; los "motores" moleculares que mueven estos filamentos y generan las fuerzas necesarias para las actividades motrices, y las calidades dinámicas que controlan la organización espacial, el ensamble y el desensamble de los diversos elementos del citoesqueleto. A continuación se presenta una breve revisión de unas cuantas de las estrategias más importantes para el estudio del citoesqueleto.

El uso de la microscopia con fluorescencia en células vivas

El concepto de que las células eucariotas contenían una red de elementos de citoesqueleto surgió de estudios de cortes hísticos con el microscopio electrónico en los decenios de 1950 y 1960. Sin embargo, el microscopio electrónico sólo produce imágenes estáticas y no brinda mucha información respecto a la estructura dinámica y la función de los diversos componentes del citoesqueleto. La apreciación del carácter dinámico del citoesqueleto avanzó mucho durante los últimos decenios como resultado de una revolución en la microscopia óptica. El microscopio de fluo-

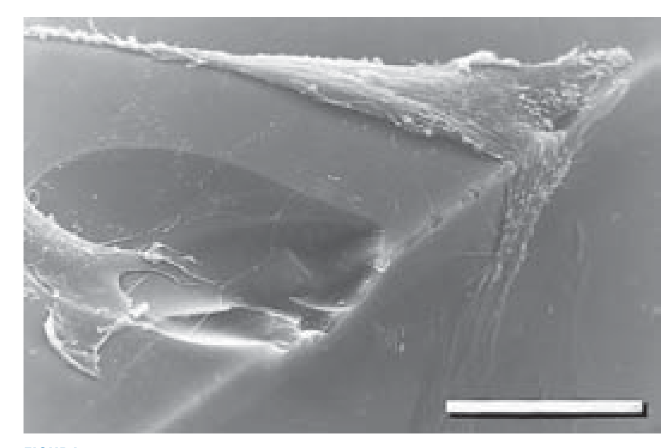


FIGURA 9-3 La naturaleza dinámica del citoesqueleto resulta evidente en este fibroblasto de ratón que migra sobre el borde a 90° de un cubreobjetos. La barra representa 30 µm. (Tomada de Guenter Albrecht-Buehler, Int Rev Cytol 120:211, 1990.)

rescencia (sección 18.1) tiene una participación preponderante en esta revolución al permitir a los investigadores observar en forma directa los procesos moleculares en las células vivas, un método que se conoce como *visualización de células vivas*.

En la técnica más usual se sintetizan proteínas con marcas fluorescentes dentro de una célula como una proteína fusionada que contiene proteína verde fluorescente (GFP). Esta técnica se describió en el capítulo anterior (pág. 277) y en la figura 9-2 se muestra un ejemplo. En una técnica alternativa las subunidades proteicas de las estructuras del citoesqueleto (p. ej., tubulina o queratina purificada) se marcan con fluorescencia *in vitro* mediante enlace covalente con un pequeño pigmento fluorescente. Las subunidades marcadas se aplican luego por microinyección en una célula viva, donde se incorporan en la forma polimérica de la proteína, como un microtúbulo o un filamento intermedio. El comportamiento dinámico de la estructura fluorescente puede seguirse en el tiempo conforme la célula realiza sus actividades normales. La figura 9-4 muestra los cambios drásticos en la longitud y la orientación de los microtúbulos individuales en el borde líder de una célula que se inyectó con tubulina marcada con un producto fluorescente.

Si se inyectan cantidades muy pequeñas de proteína con marca fluorescente, los filamentos del citoesqueleto ya no lo hacen de manera uniforme como en la figura 9-4, sino que contienen pocas partículas fluorescentes a espacios irregulares. Estas partículas fluorescentes sirven como marcadores fijos para seguir los cambios dinámicos en la longitud y la orientación del filamento. La figura 9-27 presenta un ejemplo de esta técnica, que se conoce como *microscopia de partículas con fluorescencia.*

La microscopia de fluorescencia también puede usarse para revelar la localización de una proteína en concentraciones muy bajas dentro de la célula. Este tipo de experimento se realiza mejor con anticuerpos marcados con fluorescencia que se unen con gran afinidad a la proteína que se busca. Los anticuerpos son muy útiles porque se distinguen entre variantes muy similares (isomorfas) de una proteína. La proteína puede localizarse mediante la inyección del anticuerpo marcado en una célula viva, lo que también revela la función de la proteína blanco porque la unión del anticuerpo casi siempre elimina la capacidad de la proteína para efectuar su actividad normal. Una alternativa consiste en identificar la localización de la proteína blanco con la adición del anticuerpo fluorescente a células fijas o cortes hísticos, como se ilustra en la figura 9-5.

FIGURA 9-4 Cambios dinámicos en la longitud de los microtúbulos dentro de una célula epitelial. *a*) A la célula se le inyectó un pequeño volumen de tubulina que se había unido mediante enlaces covalentes con el pigmento fluorescente rodamina. Tras permitir el transcurso del tiempo para que la célula incorporara la tubulina marcada en los microtúbulos, una pequeña porción del borde de la célula viva se examinó con el microscopio de fluorescencia. En el margen inferior derecho de cada imagen se muestran los segundos transcurridos. Se imprimió un color falso a los microtúbulos para incrementar su contraste. Puede verse que un microtúbulo "pionero" (punta de flecha) crece hasta el borde líder de la célula, donde se flexiona y luego continúa su crecimiento en dirección paralela al margen celular. El ritmo de crecimiento de los microtúbulos doblados paralelos fue mucho mayor que el de aquellos que crecen perpendiculares al borde de la célula. La barra representa 10 μm. (Tomada de Clare M. Waterman-Storer y E. D. Salmon, J Cell Biol 139:423, 1997, mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

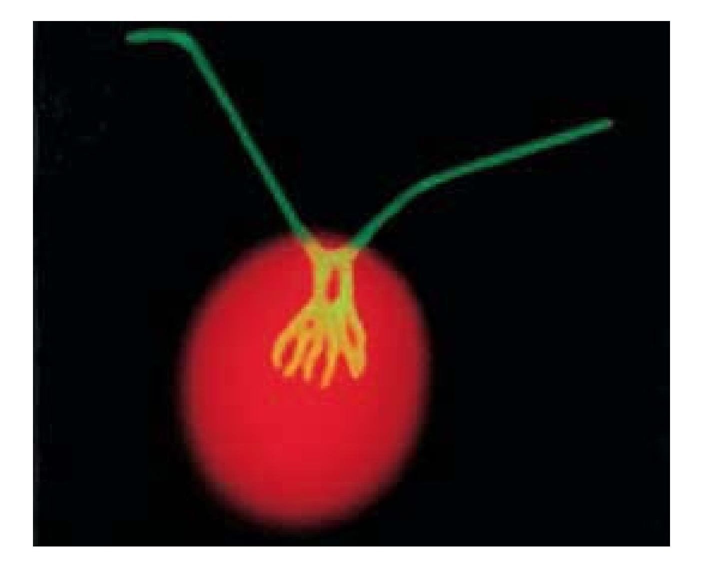


FIGURA 9-5 Localización de una proteína dentro de una célula mediante el uso de anticuerpos fluorescentes. Esta célula de alga se tiñó con anticuerpos fluorescentes (color amarillo-verde) dirigidos contra una proteína llamada centrina. La centrina se ve localizada dentro del flagelo celular y la estructura similar a una raíz en la base de los flagelos. El color rojo de la célula se debe a la autofluorescencia de las moléculas de clorofila de esta alga fotosintética. (Tomada de Mark A. Sanders y Jeffrey L. Salisbury de la Clínica Mayo. Cell 70:533, 1992. Con autorización de Cell Press.)

Uso de ensayos de motilidad de una sola molécula in vitro

Las imágenes digitales capturadas con las cámaras de video modernas tienen un contraste excepcional y pueden intensificarse mediante el procesamiento de la imagen por computadora. Estas características permiten observar y fotografiar elementos que son invisibles con el microscopio óptico, como los microtúbulos de 25 nm o las vesículas de membrana de 40 nm. La aparición de la videomicroscopia de alta resolución condujo a desarrollar *ensayos de motilidad* in vitro, lo que hace posible detectar la actividad de una molécula de proteína individual que actúa como motor molecular.[1] Las pruebas con moléculas individuales permitieron a los investigadores hacer mediciones que no eran posibles con las técnicas bioquímicas estándar que promedian los resultados obtenidos de grandes cantidades de moléculas. En un tipo de prueba, los microtúbulos se unen a un cubreobjetos de vidrio. Después cuentas microscópicas que contienen proteínas motoras unidas se colocan justo sobre los microtúbulos mediante rayos láser enfocados. Los rayos láser pasan a través de la lente del objetivo de un microscopio y ello produce una débil fuerza de atracción cerca del punto del foco. Como puede sujetar objetos microscópicos, este aparato se conoce como *pinzas ópticas*. Bajo las condiciones apropiadas y con la presencia de ATP (trifosfato de adenosina) como fuente de energía, los movimientos de una cuenta a lo largo de un microtúbulo pueden seguirse con una cámara de video (fig. 9-6), lo que revela el tamaño de los pasos individuales que la proteína motora realiza. Los rayos láser enfocados también pueden emplearse para "atrapar" una sola cuenta y determinar las fuerzas diminutas (medidas como unos cuantos piconewtons, pN) generadas por una sola proteína motora cuando "intenta" mover la cuenta contra la fuerza que la trampa óptica ejerce (véase fig. 11-5).

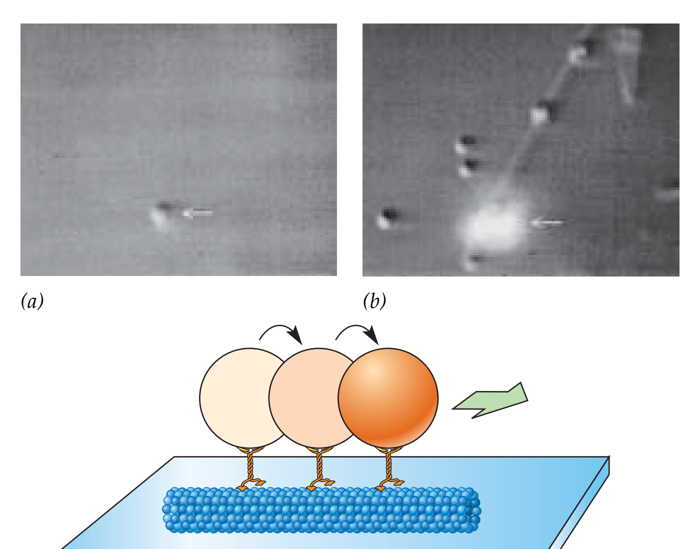
El desarrollo de técnicas para trabajar con moléculas aisladas coincidió con la creación de un nuevo campo de la ingeniería mecánica llamado **nanotecnología**. La meta de los nanotecnólogos es la creación de "nanomáquinas" diminutas (de 10 a 100 nm de tamaño) capaces de desempeñar actividades específicas en un mundo submicroscópico. Las nanomáquinas tienen muchos usos potenciales, inclusive un sitio en la medicina. Se supone que algún día estas máquinas podrán introducirse en el cuerpo humano para realizar alguna tarea específica, como el hallazgo y la destrucción de células cancerosas individuales. Mientras esto ocurre, la naturaleza ya desarrolló nanomáquinas, entre ellas las proteínas motoras que se describen en este capítulo. No es sorprendente que varios laboratorios de nanotecnología hayan empezado a usar estas proteínas motoras para mover cargamentos moleculares distintos de cualquiera que se encuentra en organismos vivos.

[1] La información básica de los motores moleculares puede encontrarse en la página 338.

El uso de células con expresión genética alterada

Una de las mejores formas para aprender acerca de la función de un polipéptido particular es estudiar el fenotipo de las células en las que ese polipéptido está ausente o no funciona. Ahora que las secuencias de los genomas de varios eucariotas ya se identificaron, los investigadores están en posición de estudiar la participación de cualesquiera de los genes que pudiera requerirse para una función particular. Por ejemplo, el análisis del genoma de la mosca de la fruta indica que estos insectos tienen más de 100 genes que codifican partes de los complejos de proteínas motoras. Cualesquiera de estos genes puede aislarse, modificarse y desactivarse por medios genéticos. Por lo general los efectos de la desactivación génica en un organismo o célula se estudian con una de tres estrategias experimentales:

1. El empleo de animales (casi siempre ratones) que carecen de algún gen específico (sección 18.18). En algunos casos los ratones con eliminación de un gen pueden mostrar pocos o ningún efecto de la proteína faltante, lo que dice muy poco al investigador respecto a la posible función de esa molécula. En otros casos los ratones que carecen de un gen particu-



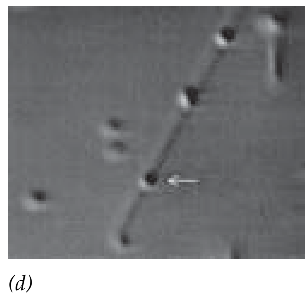
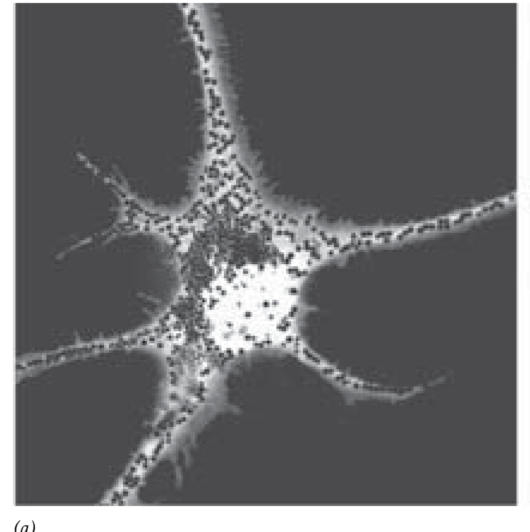


FIGURA 9-6 Uso de videomicroscopia para seguir las actividades de los motores moleculares. En esta secuencia de video: *a*) Una cuenta, que está cubierta con la proteína motora cinesina, se captura fuera de la suspensión con pinzas ópticas láser; *b*) la cuenta se deposita en un microtúbulo (el reflejo de la luz láser en la interfase cubreobjetos-agua oscurece la imagen); *c* y *d*) la cuenta se une con el microtúbulo y comienza a moverse a lo largo del riel microtubular. *e*) Esquema del movimiento de una de estas cuentas sobre un microtúbulo. (Tomada de M. Block, L. S. B. Goldstein y Bruce J. Schnapp. Reimpresa con autorización de Nature 348:349, 1990. © Derechos reservados 1990, Macmillan Magazines, Ltd.)


(a)

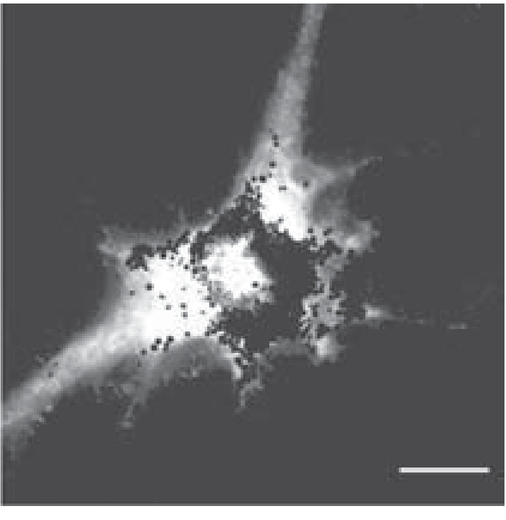

(b)

FIGURA 9-7 La expresión de una proteína motora mutante inhibe la dispersión de gránulos de pigmento en una célula pigmentaria. *a*) Una célula pigmentaria control del anfibio *Xenopus* muestra los gránulos de pigmento negro dispersos en los procesos celulares alargados. *b*) Una célula pigmentaria con expresión excesiva de un gen para una proteína motora mutante. Ésta interfiere con la actividad de la proteína normal producida en la célula e inhibe la dispersión de los gránulos de pigmento. Este resultado indica la participación de esta proteína motora en el transporte centrífugo de estos gránulos limitado por membrana. La barra representa 20 µm. (Tomada de M. Carolina Tuma et al., cortesía de Vladimir Gelfand, J Cell Biol 143:1551, 1998, mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

lar presentan defectos muy específicos, lo que sugiere que la proteína desempeña una función importante en el proceso defectuoso. Es posible que los ratones con eliminación de genes mueran durante las etapas iniciales del desarrollo, pero las células de estos embriones anormales pueden aislarse y cultivarse, lo que permite estudiar la deficiencia molecular (véase fig. 9-16). Por ejemplo, los ratones que no tienen una proteína motora llamada dineína citoplásmica no se desarrollan durante más de ocho días. El estudio de las células de estos embriones reveló que el aparato de Golgi estaba fragmentado y disperso por todo el citoplasma. Estos hallazgos sugieren que la dineína citoplásmica tiene una función esencial en la situación del aparato de Golgi dentro de la célula.

2. La utilización de células con expresión excesiva de una proteína *mutante negativa dominante*, o sea células que elaboran grandes cantidades de una proteína no funcional. Las células de este tipo suelen producirse por transfección, o sea, hacer que las células capten DNA (ácido desoxirribonucleico) alterado y lo incorporen en sus cromosomas. Una vez que el genoma de las células se modifica, la proteína mutante compite con la proteína normal o interfiere de algún otro modo con su función, lo que ocasiona que la célula presente el fenotipo mutante. La figura 9-7 ilustra un ejemplo de esta estrategia experimental. La figura 9-7*a* muestra una célula pigmentaria control del anfibio *Xenopus* que se trató con una hormona que induce la dispersión de los gránulos de pigmento en los procesos celulares periféricos. En el animal completo, esta respuesta tiene el efecto de aclarar la piel. La célula pigmentaria de la figura 9-7*b*, que se trató con la misma hormona, contiene una versión mutante con expresión excesiva de una proteína motora denominada cinesina II. La falta de dispersión de los gránulos en la célula implica que la cinesina II es la proteína motora que se encarga del movimiento centrífugo de estos gránulos.
3. En la actualidad se estudia el uso de pequeñas moléculas de RNA de cadena doble (siRNA) que son complementarias al mRNA (ácido ribonucleico mensajero) que codifica una proteína particular. Como se expone en las secciones 11.5 y 18.18, las moléculas de siRNA pueden inyectarse o agregarse a las células y bloquean la síntesis de cualquier proteína codificada por un mRNA que contenga la secuencia de nucleótidos del siRNA. Como es más fácil sintetizar una pequeña molécula de RNA que generar un animal con carencia génica o un mutante negativo dominante; esta técnica, llamada *interferencia de RNA*, se convirtió en una estrategia frecuente en los últimos años para investigar el efecto de la falta de una proteína.

REVISIÓN

1. Describa un ejemplo en el que cada una de las metodologías siguientes haya contribuido al conocimiento de la naturaleza del citoesqueleto: microscopia de fluorescencia, pruebas de motilidad in vitro y alteración de la expresión génica.
2. Liste algunas de las principales funciones del citoesqueleto.

9.3 MICROTÚBULOS

Estructura y composición

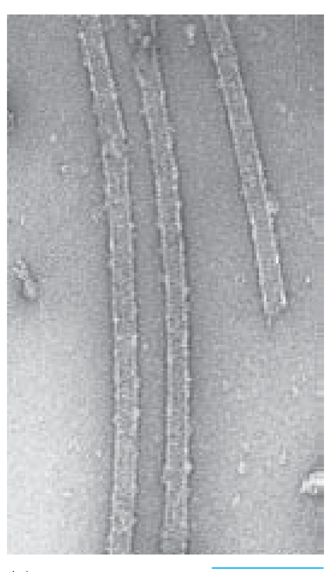
Como su nombre lo indica, los microtúbulos son estructuras tubulares huecas y se encuentran en casi todas las células eucariotas. Los microtúbulos forman parte de muchas estructuras diversas, como el huso mitótico de las células que se dividen y el centro de cilios y flagelos. Los microtúbulos tienen un diámetro externo de 25 nm, una pared con grosor aproximado de 4 nm y pueden extenderse a lo largo o ancho de la célula. La pared de un microtúbulo está formada por proteínas globulares dispuestas en hileras longitudinales, conocidas como **protofilamentos**,

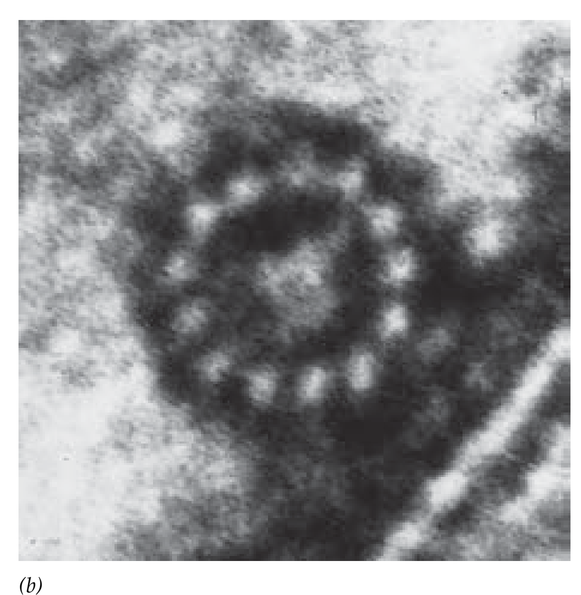
que se alinean en paralelo con respecto al eje longitudinal del túbulo (fig. 9-8*a*). Cuando se observan en un corte transversal, puede verse que los microtúbulos están formados por 13 protofilamentos alineados lado a lado en un círculo dentro de la pared (fig. 9-8*b*). Se cree que las interacciones no covalentes entre protofilamentos adyacentes tienen una función importante para mantener la estructura del microtúbulo.

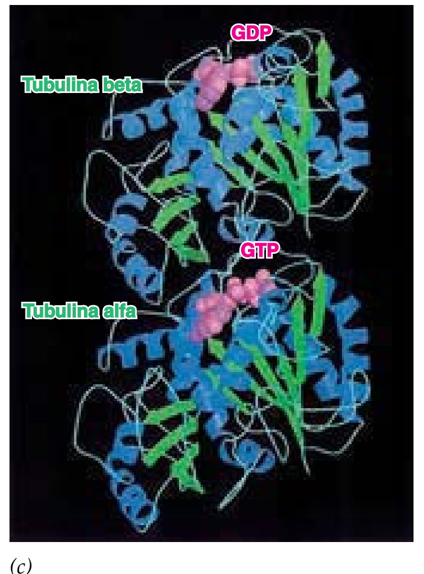
Cada protofilamento se ensambla a partir de bloques diméricos de construcción consistentes en una subunidad tubulina alfa y una tubulina beta. Los dos tipos de subunidades de tubulina tienen una estructura tridimensional similar y se aglomeran con fuerza como se muestra en la figura 9-8*c*. Los dímeros de tubulina se organizan en un patrón lineal a lo largo de cada protofilamento, observándose esto en la figura 9-8*d*. Ya que cada unidad de ensamble contiene dos componentes no idénticos (un heterodímero), el protofilamento es asimétrico, con una tubulina alfa en un extremo y una tubulina beta en el otro. Todos los protofilamentos de un microtúbulo poseen la misma polaridad. Por consiguiente todo el polímero tiene la misma polaridad. Un extremo del microtúbulo se conoce como el *extremo más* y termina con una fila de subunidades beta (fig. 9-8*d*). El extremo contrario es el *extremo menos* y concluye con una fila de subunidades de tubulina alfa. Como se explica más adelante en el capítulo, la polaridad estructural de los microtúbulos es un factor importante en el crecimiento de estas estructuras y su capacidad para participar en actividades mecánicas dirigidas.

Proteínas relacionadas con los microtúbulos

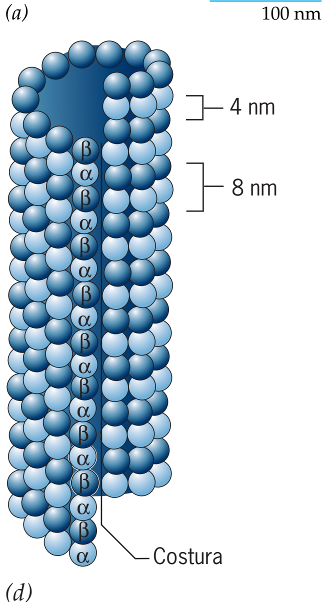
Por lo general los microtúbulos preparados a partir de tejido vivo contienen proteínas adicionales, llamadas **proteínas relacionadas con microtúbulos** (o **MAP**, por sus siglas en inglés). Las MAP casi siempre tienen un dominio que se une al lado de un microtúbulo y otro dominio que sobresale hacia fuera como un filamento de la superficie del microtúbulo. La figura 9-9 muestra la unión de MAP2 a la superficie de un microtúbulo. Algunas MAP pueden verse en micrografías electrónicas como puentes que conectan los microtúbulos entre sí, lo que mantiene su alineación paralela. Las MAP suelen incrementar la estabilidad de los microtúbulos y promover su ensamble. La actividad de unión


(*a*) 100 nm


(*b*)



(*c*)



(*d*)

FIGURA 9-8 Estructura de los microtúbulos. *a*) Micrografía electrónica de microtúbulos con tinción negativa del cerebro donde se muestran las subunidades globulares que forman los protofilamentos. Los bultos en la superficie de los microtúbulos son proteínas relacionadas con microtúbulos (MAP), que se explican más adelante. *b*) Micrografía electrónica de un corte transversal a través de un microtúbulo de una célula de la punta de la raíz de *Juniperus* que revela las 13 subunidades dispuestas dentro de la pared del túbulo. Los microtúbulos de estas células vegetales son más abundantes en una zona cortical de unos 100 nm de grueso justo debajo de la membrana plasmática (se observan en la parte inferior derecha de la micrografía). *c*) Un modelo de listón que muestra la estructura tridimensional del heterodímero de tubulina alfa-beta. Nótense las formas complementarias de las subunidades en las superficies que interactúan una con otra. La subunidad de tubulina alfa está unida con un GTP, que no se hidroliza y no es intercambiable. La subunidad de tubulina beta tiene un GDP unido, que se intercambia por un GTP antes de ensamblarse en el polímero (pág. 347). El extremo más del dímero está arriba. *d*) Diagrama de un corte longitudinal de un microtúbulo mostrado en celosía B, que es la estructura que se cree existe en la célula. La pared consiste en 13 protofilamentos formados por heterodímeros de tubulina alfa-beta apiladas con una disposición cabeza a cola. Los protofilamentos adyacentes no se alinean en registro, sino que se intercalan cada 1 nm para que las moléculas de tubulina formen un conjunto helicoidal alrededor de la circunferencia del microtúbulo. La hélice se interrumpe en un sitio en el que las subunidades alfa y beta hacen los contactos laterales. Esto produce una "costura" que corre a lo largo del microtúbulo. (*A*, TOMADA DE LINDA A. AMOS, J CELL BIOL, 72:645, 1997, MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS; *B*, REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE MYRON C. LEDBETTER, J AGR FOOD CHEM 13:406, 1965. © DERECHOS RESERVADOS 1965, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY; *C*, CORTESÍA DE EVA NOGALES Y KENNETH DOWNING.)

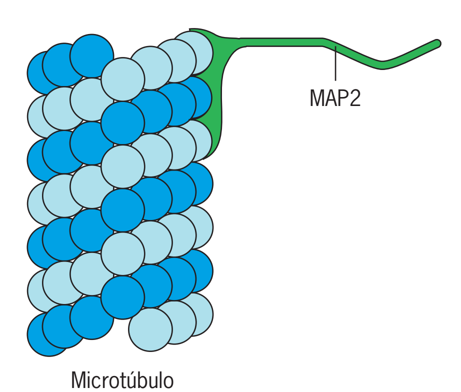


FIGURA 9-9 Proteínas relacionadas con microtúbulos (MAP). Representación esquemática de una molécula MAP2 del cerebro unida a la superficie de un microtúbulo. La molécula MAP2 que se muestra en esta figura contiene tres sitios de unión con tubulina conectados por segmentos cortos de la cadena polipeptídica. (Una isoforma alternativa contiene cuatro sitios de unión.) Los sitios de unión están espaciados a distancia suficiente para permitir que la molécula MAP2 se una con tres subunidades de tubulina separadas en la pared del microtúbulo. Las colas de las moléculas MAP se proyectan hacia afuera, lo que les permite interactuar con otros componentes celulares.

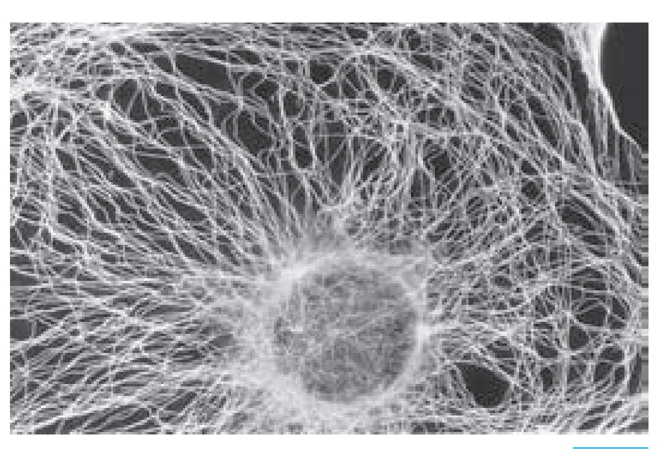


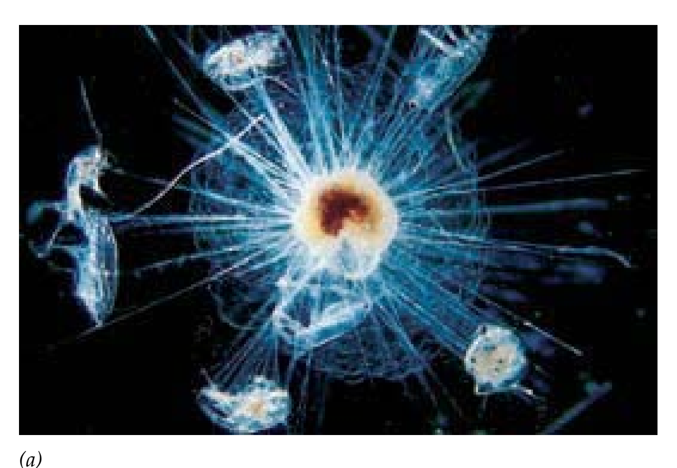
FIGURA 9-10 La localización de los microtúbulos de una célula de ratón cultivada y aplanada; se revela con anticuerpos fluorescentes contra tubulina. Se observa que los microtúbulos se extienden desde la región perinuclear de la célula con una disposición radial. Los microtúbulos individuales pueden seguirse y se ve que forman curvas graduales conforme se adaptan a la forma de la célula. (TOMADA DE MARY OSBORN Y KLAUS WEBER, CELL 12:563, 1977. CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS.)

con microtúbulos de las diversas MAP se controla sobre todo con la adición y el retiro de grupos fosfato de residuos de aminoácidos particulares. Se cree que un nivel demasiado alto de fosforilación de una MAP particular, llamada *tau*, participa en el desarrollo de varios trastornos neurodegenerativos letales. Las células cerebrales de las personas con estas enfermedades contienen filamentos extraños y enredados (*marañas neurofibrilares*) formados por moléculas tau con fosforilación excesiva e incapaces de unirse con los microtúbulos. Al parecer los filamentos neurofibrilares contribuyen a la muerte de las células nerviosas. Las personas con una de estas enfermedades, la demencia hereditaria FTDP-17, tienen mutaciones en el gen *tau*, lo que indica que la alteración de la proteína tau es la causa primaria de este trastorno.

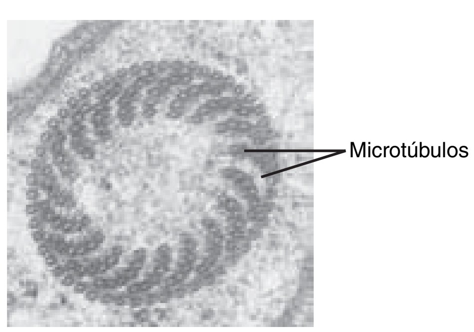
Microtúbulos como soportes y organizadores estructurales

Los microtúbulos son lo bastante rígidos para resistir fuerzas que pudieran comprimir o doblar la fibra. Esta propiedad les permite brindar soporte mecánico, tal como las vigas de acero sostienen un edificio alto de oficinas o los postes que sostienen la estructura de una tienda. La distribución de los microtúbulos citoplásmicos en una célula ayuda a determinar la forma de la misma. En células animales cultivadas, los microtúbulos se extienden con un patrón radial desde el área alrededor del núcleo hacia la periferia, lo que confiere su forma redondeada y aplanada a estas células (fig. 9-10). En cambio, los microtúbulos de las células epiteliales cilíndricas casi siempre están orientados con el eje longitudinal paralelo al eje mayor de la célula (fig. 9-1*a*). Esta configuración sugiere que los microtúbulos ayudan a mantener la forma alargada de la célula.

La función de los microtúbulos como elementos esqueléticos es evidente en ciertos procesos celulares muy alargados, como los cilios y los flagelos, o los axones de las neuronas. Un ejemplo impresionante de la participación de los microtúbulos



(a)



(b)

FIGURA 9-11 Microtúbulos como bastones de soporte. *a*) Este protista tiene axópodos que se proyectan desde el cuerpo celular. *b*) Los axópodos se sostienen con un conjunto espiral elaborado de microtúbulos. (*A*, TOMADA DE PETER PARKS/ANIMALS ANIMALS; *B*, CORTESÍA DE MANFRED HAUSER.)

en el mantenimiento de la forma celular se observa en los largos procesos delgados axopodales de los protistas heliozoarios (fig. 9-11). Cada axópodo contiene una estructura central formada

(a)

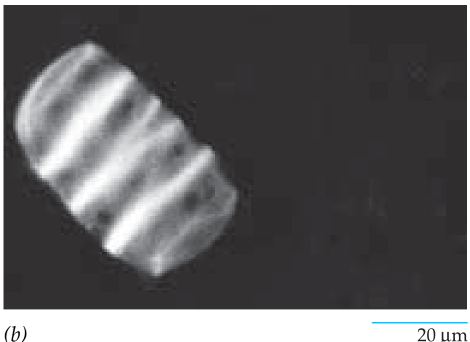

(b)

FIGURA 9-12 Relación espacial entre la orientación del microtúbulo y el depósito de celulosa en las células vegetales. Se aplicó tinción doble a una célula mesófila de trigo para observar los microtúbulos *a* y la celulosa de la pared celular *b*. Es evidente que los microtúbulos corticales y las microfibrillas de celulosa están alineados en la misma dirección. (Tomada de Georg Jung y Wolfgang Wernicke, Protoplasma 53:145, 1990.)

por grandes cantidades de microtúbulos dispuestos en espiral, con microtúbulos individuales que atraviesan toda la longitud del proceso.

En las células vegetales los microtúbulos desempeñan una función indirecta en el mantenimiento de la forma celular mediante su influencia en la formación de la pared celular. Durante la interfase, la mayoría de los microtúbulos de una célula vegetal se localiza justo debajo de la membrana plasmática (como en la figura 9-8*b*) y forma una zona cortical distintiva. Se cree que los microtúbulos de la corteza influyen en el movimiento de las enzimas que sintetizan celulosa y que se localizan en la membrana plasmática (véase fig. 7-37). Como resultado las microfibrillas de celulosa de la pared celular se ensamblan con una orientación paralela a los microtúbulos subyacentes de la corteza (fig. 9-12). La orientación de estas microfibrillas de celulosa tiene una participación importante en la determinación de las características de crecimiento de la célula y por tanto en su forma. En casi todas las células las microfibrillas de celulosa recién sintetizadas y los microtúbulos alineados se disponen en dirección perpendicular con el eje longitudinal de la célula (transversal), como aros alrededor de un barril (fig. 9-12). Puesto que las microfibrillas de celulosa resisten la expansión lateral, la presión de turgencia que la célula ejerce se dirige a los extremos de la célula, lo que ocasiona su elongación.

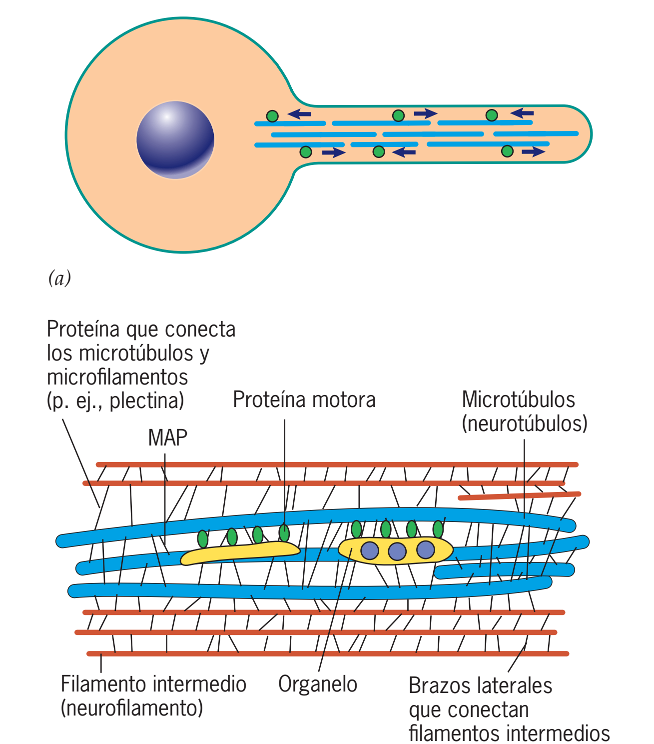
También se cree que los microtúbulos participan en el mantenimiento de la organización interna de las células. El tratamiento de las células con agentes que rompen los microtúbulos puede afectar mucho la localización de organelos membranosos, inclusive el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. El aparato de Golgi casi siempre se ubica cerca del centro de una célula animal, justo fuera del núcleo. El tratamiento de las células con nocodazol o colquicina puede dispersar los elementos de Golgi hacia las regiones periféricas de la célula. Las membranas de Golgi regresan a su posición normal en el interior de la célula cuando el fármaco se retira y los microtúbulos se reensamblan.

Microtúbulos como agentes de motilidad intracelular

Las células vivas están repletas de actividad mientras las macromoléculas y los organelos se mueven de manera dirigida de un sitio a otro. Aunque todo este ajetreo puede apreciarse al observar el movimiento de materiales específicos en una célula viva, los procesos subyacentes suelen ser difíciles de estudiar porque la mayoría de las células carece de un citoesqueleto muy ordenado. Por ejemplo, se sabe que el transporte de materiales de un compartimiento de membrana a otro depende de la presencia de microtúbulos porque la interrupción específica de estos elementos citoesqueléticos detiene los movimientos. El estudio de la motilidad intracelular se iniciará con las células nerviosas, cuyos movimientos intracelulares dependen de un conjunto muy organizado de microtúbulos y otros filamentos del citoesqueleto.

Transporte axónico El axón de una neurona motora individual puede prolongarse desde la médula espinal hasta la punta de un dedo de la mano o del pie. El centro de manufactura de esta neurona es su cuerpo celular, una porción redondeada de la célula que se encuentra dentro de la porción ventral de la médula espinal. Cuando se inyectan aminoácidos marcados en el cuerpo celular, se incorporan a proteínas marcadas que se mueven hacia el axón y viajan por toda su extensión. Muchos materiales distintos, entre ellos moléculas neurotransmisoras, se incluyen en compartimientos dentro de vesículas membranosas en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi del cuerpo celular, y luego se transportan por toda la longitud del axón (fig. 9-13*a*). Los cargamentos que no se unen a membranas, como el RNA, los ribosomas y aun elementos del citoesqueleto, también se transportan por esta vasta extensión de citoplasma alargado. Los diferentes materiales se mueven a distintos ritmos y el transporte axónico más rápido alcanza velocidades de 5 μm por segundo. A este ritmo, una vesícula sináptica jalada por proteínas motoras de dimensiones nanométricas pueden viajar 40 cm en un solo día, o casi la mitad de la distancia entre la médula espinal y la punta de un dedo. Se dice que las estructuras y los materiales que viajan desde el cuerpo celular hasta las terminaciones de una neurona se mueven en dirección *anterógrada*. Otras estructuras, como las vesículas endocíticas que se forman en las terminaciones nerviosas y transportan factores desde las células blanco, se mueven en dirección contraria, o *retrógrada*: desde la sinapsis hacia el cuerpo celular. Los defectos en el transporte anterógrado y retrógrado se han vinculado con varias afecciones neurológicas.

Los axones están llenos de estructuras del citoesqueleto, inclusive haces de microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos interconectados de varias maneras (fig. 9-13*b*, *c*). Con la videomicroscopia, los investigadores pueden seguir vesículas individuales mientras se mueven a lo largo de los microtúbulos de un axón, ya sea hacia el cuerpo celular o en sentido contrario (fig. 9-14). Estos movimientos son mediados principalmente por microtúbulos (fig. 9-13*c*), que sirven como vías para una variedad de **proteínas motoras** que generan las fuerzas necesarias a fin de mover objetos dentro de una célula. El estudio de las



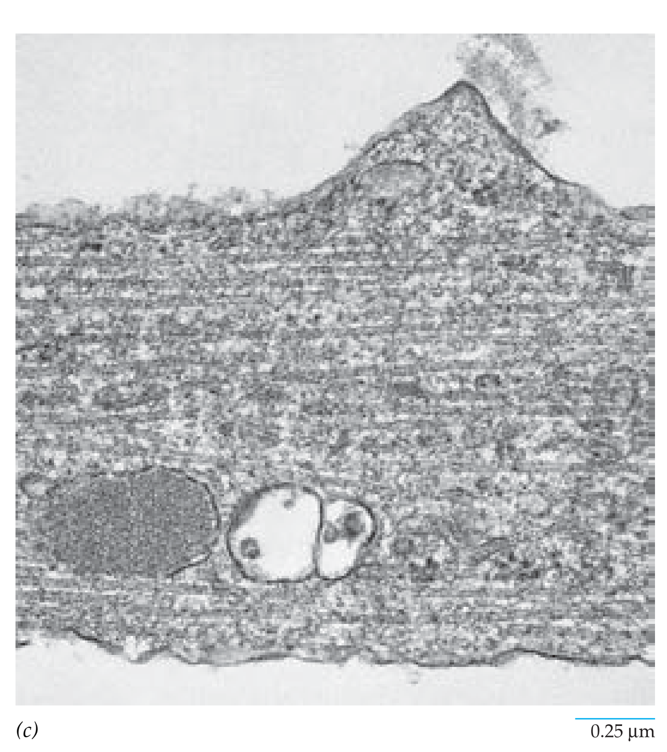
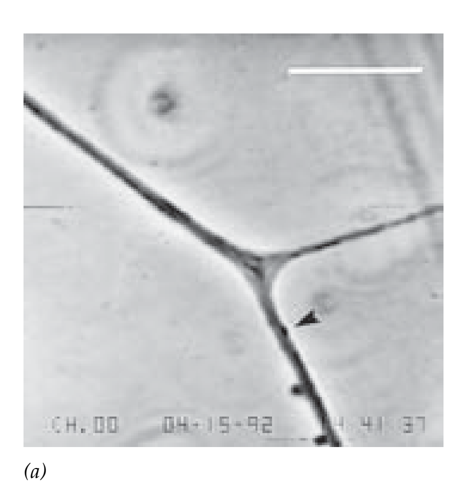
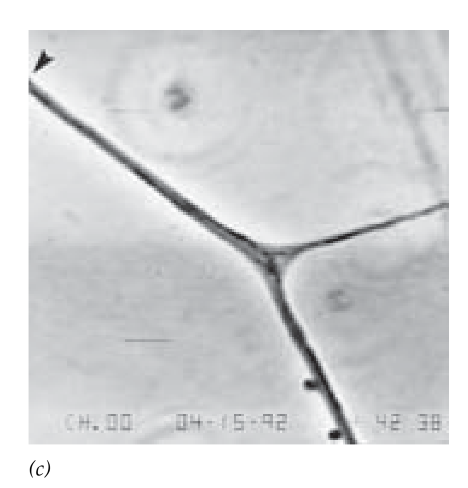


FIGURA 9-13 Transporte axónico. *a*) Esquema de una célula nerviosa que muestra el movimiento de las vesículas por un axón sobre los rieles de los microtúbulos. Las vesículas se mueven en ambos sentidos dentro del axón. *b*) Esquema de la organización de los microtúbulos y los filamentos intermedios (neurofilamentos) dentro de un axón. Las vesículas que contienen los materiales transportados se unen con los microtúbulos mediante proteínas de enlace, que comprenden proteínas motoras como la cinesina y la dineína. *c*) Micrografía electrónica de una porción del axón de una célula nerviosa cultivada, que muestra los numerosos microtúbulos paralelos que funcionan como rieles para el transporte axónico. En el microscopio óptico se observó que los dos organelos limitados por membrana que son mostrados en esta micrografía se movían a lo largo del axón en el momento en que la célula nerviosa se fijó. (*C*, TOMADA DE A. C. BREUER, C. N. CHRISTIAN, M. HENKART Y P. G. NELSON, J CELL BIOL 65:568, 1975, MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)



(a)

(b)



(c)

FIGURA 9-14 Visualización del transporte axónico. *a* a *c*) Estas micrografías de video muestran la progresión de un organelo membranoso a lo largo de un axón ramificado. El cuerpo celular queda fuera del campo arriba a la izquierda, en tanto las terminaciones (conos de crecimiento, página 381) están fuera del campo abajo a la derecha. La posición del organelo está indicada por las puntas de flecha. El organelo que se sigue (una vacuola autofágica) se mueve en dirección retrógrada por el punto de ramificación y continúa su movimiento hacia el cuerpo celular. La barra representa 10 µm. (TOMADA DE PETER J. HOLLENBECK, J CELL BIOL 121:307, 1993, MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

proteínas motoras es un tema central de la biología celular y molecular, y se cuenta con mucha información de la naturaleza de estas moléculas así como de su mecanismo de acción, que son los temas de la sección siguiente.

Proteínas motoras que cruzan el citoesqueleto microtubular

Las proteínas motoras de una célula convierten la energía química (almacenada en ATP) en energía mecánica, que se emplea para mover el cargamento celular unido al motor. Los tipos de cargamento celular que estas proteínas transportan comprenden vesículas, mitocondrias, lisosomas, cromosomas y otros filamentos del citoesqueleto. Una sola célula puede contener docenas de proteínas motoras diferentes y se supone que cada una está especializada en el movimiento de tipos particulares de cargamento en una región especial de la célula. En conjunto, las proteínas motoras pueden agruparse en tres grandes familias: cinesinas, dineínas y miosinas. Las cinesinas y las dineínas se mueven a lo largo de los microtúbulos, en tanto que las miosinas lo hacen a lo largo de microfilamentos. No se conoce ningún motor proteico que utilice los filamentos intermedios como rieles. Esto no resulta sorprendente si se considera que los filamentos intermedios no están polarizados y por tanto no proporcionan señales direccionales al motor.

Las proteínas motoras se mueven por pasos en una sola dirección a lo largo del riel de citoesqueleto, de un sitio de unión al siguiente. Conforme la proteína avanza, experimenta varios cambios en la conformación que constituyen un *ciclo mecánico.* Los pasos del ciclo mecánico se coordinan con los de un ciclo *químico* (o *catalítico*), el cual proporciona la energía necesaria para impulsar la actividad del motor (véase la figura 9-61 para obtener un ejemplo). Los pasos del ciclo químico abarcan la unión de una molécula de ATP con el motor, la hidrólisis de ATP, la liberación de los productos (ADP [difosfato de adenosina] y P_i) del motor y la unión de una nueva molécula de ATP. La unión e hidrólisis de una sola molécula de ATP se emplea para impulsar un golpe de poder que mueve el motor un número preciso de nanómetros sobre el riel. Conforme la proteína motora se mueve a los sitios sucesivos sobre el polímero del citoesqueleto, los ciclos mecánico y químico se repiten una y otra vez, lo que tira del cargamento distancias considerables. Hay que tener presente que se trata de motores de tamaño molecular que, a diferencia de las máquinas hechas por el hombre, dependen mucho de su ambiente. Por ejemplo, las proteínas motoras no tienen *momentum* (inercia) y están sometidas a una resistencia tremenda por la fricción con su ambiente. Como resultado una proteína motora se detiene casi de inmediato una vez que el aporte de energía cesa.

Se iniciará con el examen de la estructura molecular y las funciones de las cinesinas, los más pequeños y mejor comprendidos de los motores microtubulares.

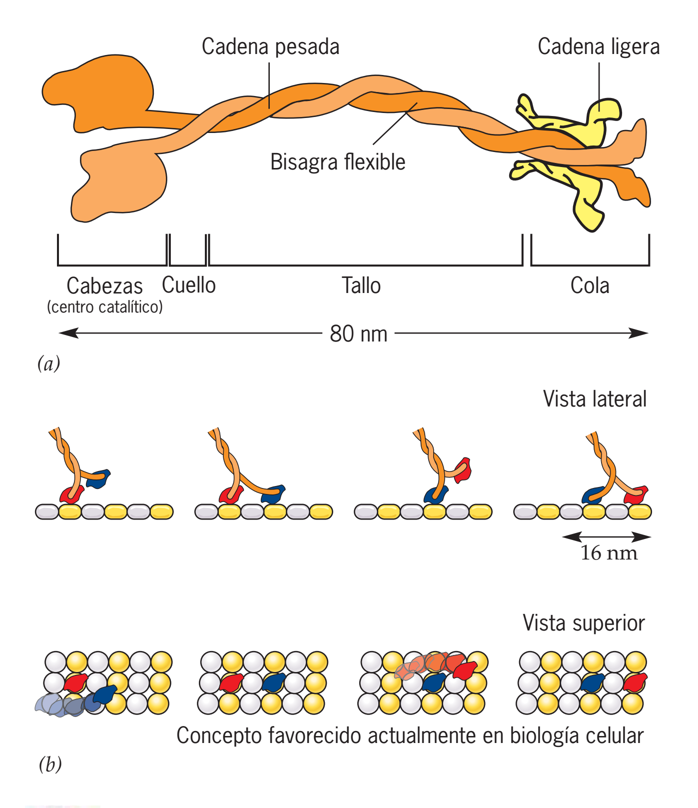
Cinesinas En 1985, Ronald Vale y sus colegas aislaron una proteína motora del citoplasma de los axones de calamar gigante que usaban los microtúbulos como rieles. Esta proteína se denominó **cinesina** y luego se encontró en casi todas las células eucariotas. La cinesina es un tetrámero construido con dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas (fig. 9-15*a*). Una molécula de cinesina tiene varias partes, incluido un par de cabezas globulares que se unen a un microtúbulo y actúan como "máquinas" generadoras de fuerza que hidrolizan ATP. Cada cabeza (o *dominio motor*) se conecta con un cuello, un pedúnculo cilíndrico y una cola con forma de abanico que se une al cargamento que debe moverse (fig. 9-15*a*). Algo sorprendente es que el dominio motor de la cinesina tiene una estructura muy similar a la de la miosina, a pesar del hecho de que la cinesina es una proteína mucho más pequeña y los dos tipos de motores operan en rieles distintos. Es casi seguro que la cinesina y la miosina evolucionaron de una proteína ancestral común presente en alguna célula eucariota primitiva.

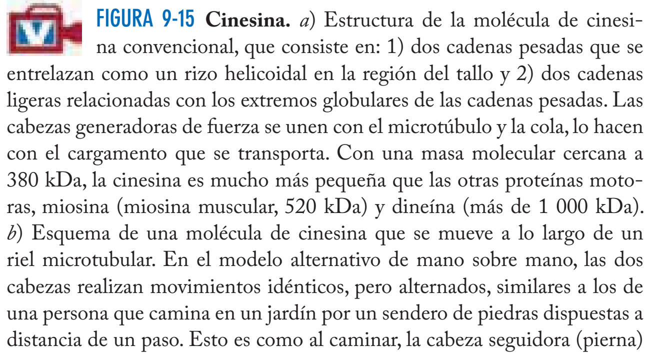
Cuando las moléculas de cinesina purificada se unen con cuentas y se observan en una prueba de motilidad in vitro (pág. 332), las cuentas se mueven a lo largo de los microtúbulos hacia su extremo más (véase fig. 9-6). Por tanto se dice que la cinesina es un *motor microtubular dirigido al lado más*. En un axón, donde todos los microtúbulos están orientados con su extremo menos hacia el cuerpo celular, la cinesina transporta cargamentos hacia las terminaciones sinápticas. El descubrimiento de la cinesina se describe en la sección Vías experimentales, que puede encontrarse en Internet en www.wiley.com/college/karp

Una sola molécula de cinesina se mueve sobre un solo protofilamento de un microtúbulo a una velocidad proporcional a la concentración de ATP (hasta una velocidad máxima de 1 μm por segundo). Cuando las concentraciones de ATP son bajas, las moléculas de cinesina transcurren lo bastante despacio para que los observadores concluyan que la proteína se mueve por pasos (fig. 9-15*b*). Cada paso es de unos 8 nm de largo, que también es la longitud de un dímero de tubulina en un protofilamento, y requiere la hidrólisis de una sola molécula de ATP. En la actualidad se acepta de manera general que la cinesina se mueve por un mecanismo "mano sobre mano" que se muestra en la figura 9-15*b*. Conforme a este modelo, que es básicamente similar a una persona que sube por una cuerda, las dos cabezas se alternan para tomar la primera o la segunda posición sin una rotación acompañante del tallo y la carga en cada paso.

El movimiento de las moléculas de cinesina, tanto in vitro como in vivo, es muy **progresivo**, lo que significa que la proteína motora tiende a moverse a lo largo de un microtúbulo individual por distancias considerables (más de 1 μm) sin caerse. Una molécula de cinesina de dos cabezas puede lograr esta hazaña porque una de las cabezas está unida con el microtúbulo en todo momento (fig. 9-15*b*). Una proteína motora con esta capacidad está bien adaptada para el transporte independiente y por largas distancias de pequeños paquetes de cargamento.

Las dos cabezas de la molécula de la cinesina se comportan en forma coordinada, de modo que siempre están en diferentes etapas de sus ciclos químicos y mecánicos en cualquier momento determinado. Cuando una cabeza se une al microtúbulo, los cambios de conformación resultantes en la región del cuello adyacente de la proteína motora hacen que la otra cabeza se mueva hacia adelante al siguiente sitio de unión en el protofilamento. Estas acciones se ilustran en la figura 9-15*c*, que muestra las porciones de la cabeza y el cuello de una cadena pesada monomérica de cinesina relacionada con un microtúbulo. La actividad catalítica de la cabeza provoca un movimiento oscilante de gran escala del cuello el cual, en esta ilustración, está unido a una molécula de GFP (la proteína verde con forma de barril) y no a una segunda cabeza de cinesina.





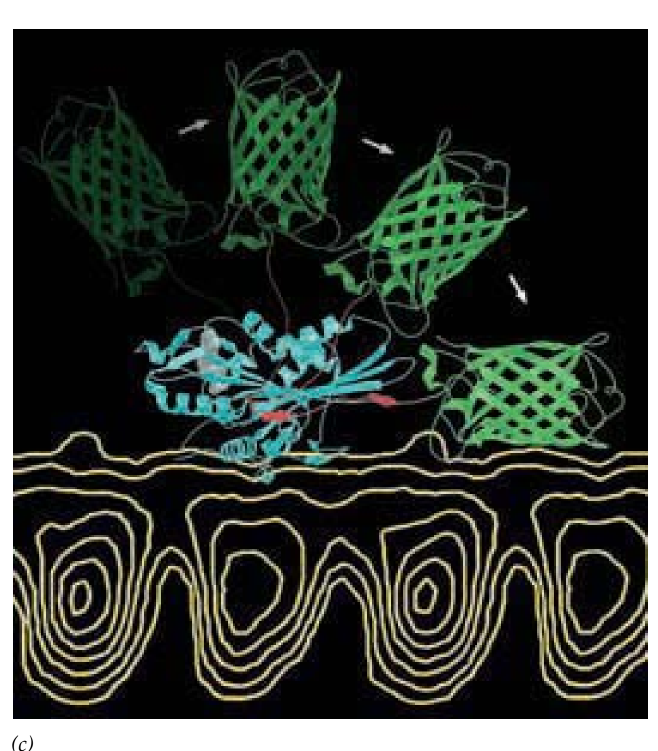


FIGURA 9-15 Cinesina. *a*) Estructura de la molécula de cinesina convencional, que consiste en: 1) dos cadenas pesadas que se entrelazan como un rizo helicoidal en la región del tallo y 2) dos cadenas ligeras relacionadas con los extremos globulares de las cadenas pesadas. Las cabezas generadoras de fuerza se unen con el microtúbulo y la cola, lo hacen con el cargamento que se transporta. Con una masa molecular cercana a 380 kDa, la cinesina es mucho más pequeña que las otras proteínas motoras, miosina (miosina muscular, 520 kDa) y dineína (más de 1 000 kDa). *b*) Esquema de una molécula de cinesina que se mueve a lo largo de un riel microtubular. En el modelo alternativo de mano sobre mano, las dos cabezas realizan movimientos idénticos, pero alternados, similares a los de una persona que camina en un jardín por un sendero de piedras dispuestas a distancia de un paso. Esto es como al caminar, la cabeza seguidora (pierna) se mueve 16 nm hacia adelante de manera alternada en el lado izquierdo y derecho del tallo (cuerpo). *c*) Cambios de conformación que ocurren en la cabeza (azul) y el cuello (rojo) de una molécula monomérica de cinesina que impulsa el movimiento de la proteína a lo largo de un microtúbulo (mapa de contorno amarillo). En lugar de conectarse con una segunda cabeza, el cuello de esta molécula trunca de cinesina se une con una molécula de proteína fluorescente (verde). En condiciones normales el movimiento de balanceo del cuello impulsará el movimiento hacia adelante de la otra cabeza, lo que permite al dímero "caminar" hacia el extremo más de un protofilamento. (*B*, TOMADA DE C. L. ASBURY, CURR. OPIN. CELL BIOL. 17:91, 2005. COPYRIGHT 2005 CON AUTORIZACIÓN DE ELSEVIER SCIENCE; *C*, TOMADA DE RYAN B. CASE ET AL., CORTESÍA DE RONALD D. VALE, CURR BIOL, VOL. 10, #3, PORTADA, 2000.)

La molécula de cinesina descubierta en 1985, conocida como "cinesina convencional" o cinesina 1, es sólo una integrante de una súper familia de proteínas relacionadas que se denominan **KLP** (***kinesin-like proteins, proteínas similares a cinesina***). Con base en el análisis de las secuencias de genoma, los mamíferos producen alrededor de 45 KLP distintas. Las porciones motoras de las KLP tienen secuencias de aminoácidos relacionadas, lo que refleja su ancestro evolutivo compartido y su función similar en los microtúbulos. En cambio, las colas de las KLP tienen secuencias diversas, lo que refleja la variedad de cargamentos que estos motores mueven. Se identifican varias proteínas diferentes como adaptadores potenciales que unen KLP específicas con sus cargamentos.

Como la cinesina 1, la mayoría de las KLP se mueve hacia el extremo más del microtúbulo al que están unidas. Sin embargo, una pequeña familia (llamada cinesina 14), que incluye la ampliamente estudiada proteína Ncd de *Drosophila* sp, se mueve en sentido contrario, esto es, al extremo menos del riel microtubular. Aunque podría esperarse que las cabezas de las KLP dirigidas al extremo más y las dirigidas al extremo menos tuvieran estructuras diferentes porque contienen los dominios motores catalíticos, las cabezas de los dos tipos de proteínas son indistinguibles. En lugar de eso, la discrepancia en la dirección del movimiento se rastreó hasta las diferencias en las regiones adyacentes del cuello de las dos proteínas. Cuando la cabeza de una molécula Ncd dirigida al extremo negativo se une con el cuello y el tallo de una molécula de cinesina, la proteína híbrida se mueve hacia el extremo positivo del riel. Por tanto, aunque la híbrida tiene un dominio catalítico que en condiciones normales se movería hacia el extremo negativo de un microtúbulo, siempre que esté unido al cuello de un motor hacia el extremo positivo, se mueve en esta última dirección.

Una tercera familia pequeña (cinesina 13) de proteínas similares a la cinesina, es incapaz de moverse. Las KLP de este grupo se unen a cualquier extremo de un microtúbulo y causan su despolarización en vez de moverse por él. Estas proteínas a

menudo se denominan *despolimerasas* de microtúbulos. El importante cometido de éstas y otras KLP durante la división celular se explorará en el capítulo 14.

Transporte de organelos mediado por cinesina En el capítulo 8 se describió cómo se mueven las vesículas de un compartimiento membranoso, como el aparato de Golgi, a otro, como un lisosoma. Los trayectos que las vesículas citoplásmicas y los organelos siguen están definidos por los microtúbulos (véase fig. 9-1) y los integrantes de la súper familia de la cinesina tienen una participación muy importante como agentes generadores de fuerza que impulsa el movimiento de este cargamento limitado por membrana. En la mayoría de las células, como en los axones, los microtúbulos se alinean con los extremos más dirigidos hacia el centro de la célula. Por tanto las cinesinas y las proteínas similares a la cinesina tienden a mover vesículas y organelos (p. ej., peroxisomas y mitocondrias) en sentido centrífugo, hacia la membrana plasmática de la célula. Lo anterior se ilustra en las micrografías de la figura 9-16. El par de micrografías de la izquierda muestra una célula aislada de un embrión normal con 9.5 días de desarrollo que se tiñó para revelar la localización de sus microtúbulos (verde) y mitocondrias (naranja). El par de micrografías de la derecha muestra una célula que se aisló de un embrión de ratón con 9.5 días de desarrollo, pero que carece de ambas copias del gen que codifica la cadena pesada KIF5B de la cinesina. Las mitocondrias de la célula deficiente en KIF5B están ausentes en las regiones periféricas de la célula, como se esperaría si esta cinesina dirigida al extremo más fuera la encargada del movimiento centrífugo de los organelos membranosos (véase también la figura 9-17*c*).

Dineína citoplásmica El primer motor relacionado con los microtúbulos se descubrió en 1963 como la proteína encargada del movimiento de cilios y flagelos. Esta proteína se denominó **dineína**. Aunque casi de inmediato se sospechó la existencia de formas citoplásmicas, pasaron 20 años antes que una proteína similar se purificara y caracterizara en el tejido cerebral de los mamíferos a la que se llamó **dineína citoplásmica**. La dineína citoplásmica se encuentra en todo el reino animal, pero su presencia en las plantas es motivo de controversia. Si bien el ser humano tiene muchas cinesinas (y miosinas) diferentes, cada una adaptada para funciones específicas, puede funcionar con sólo dos proteínas citoplásmicas, una de las cuales parece ser responsable de la mayoría de las operaciones de transporte.

La dineína citoplásmica es una proteína enorme (su masa molecular se aproxima a 1.5 millones de daltones) formada por dos cadenas pesadas idénticas y varias cadenas intermedias y ligeras (fig. 9-17*a*). Cada cadena pesada de la dineína consiste en una cabeza globular grande con dos proyecciones alargadas (tallos). La cabeza de la dineína, que es 10 veces más grande que la de la cinesina, actúa como una máquina generadora de fuerza. Cada tallo contiene el importante sitio de unión con el micro-

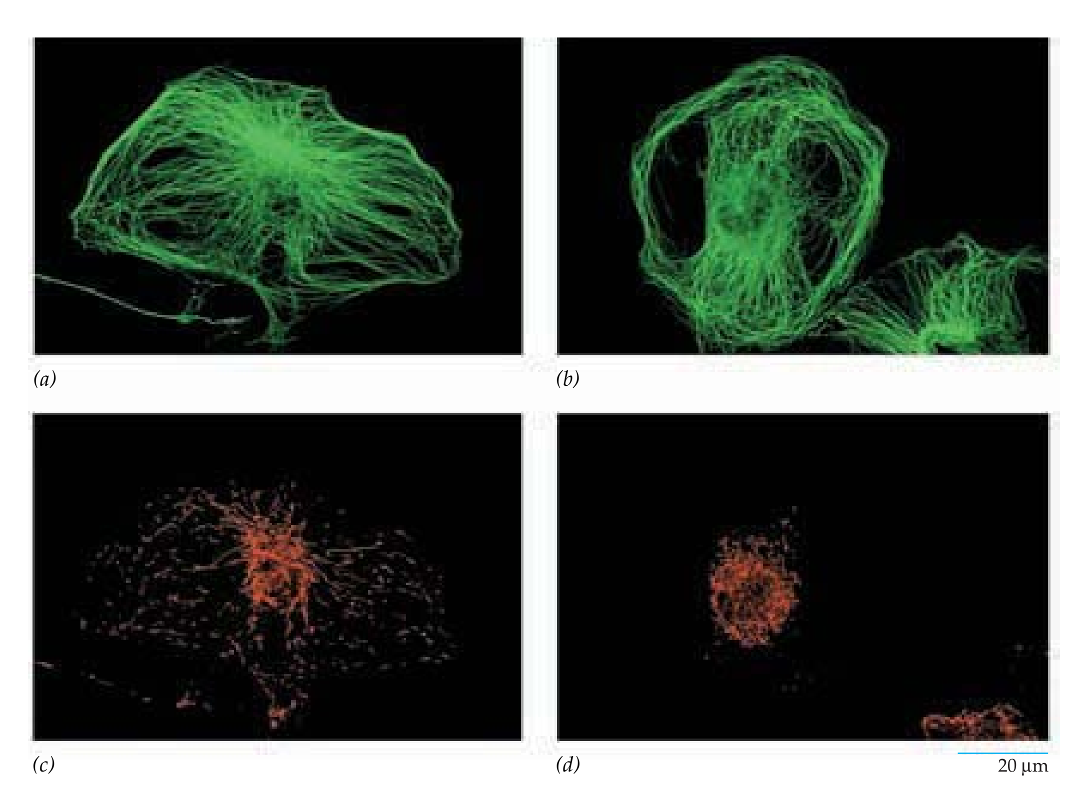


FIGURA 9-16 Alteración en el fenotipo de una célula que carece de un miembro de la súper familia de la cinesina. *a* y *c*) Célula control de tejidos extraembrionarios de un embrión normal de ratón de 9.5 días de edad teñida en *a* para los microtúbulos (verde) y en *c* para las mitocondrias (rojo). Una fracción significativa de las mitocondrias celulares se localiza a lo largo de los microtúbulos en las regiones periféricas de la célula. *b* y *d*) Una célula correspondiente obtenida de un embrión que carece de ambas copias del gen que codifica KIF5B, una de tres isoformas convencionales de cinesina en ratones y humanos. Todas las mitocondrias se aglomeran en la región central de la célula, lo que sugiere que KIF5B es la encargada de transportar las mitocondrias en sentido centrífugo. (Tomada de Yosuke Tanaka et al., cortesía de Nobutaka Hirokawa, Cell 93:1150, 1998, con autorización de Cell Press.)

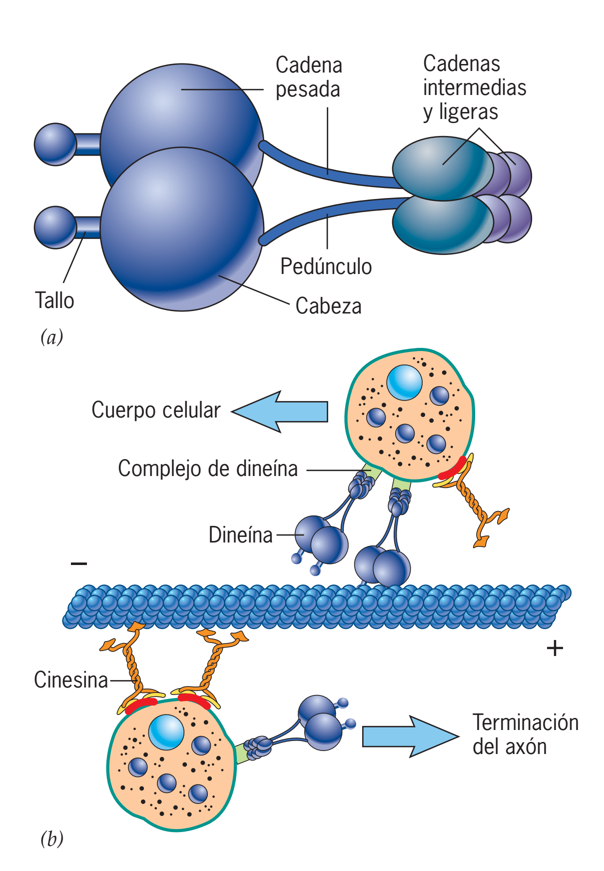


FIGURA 9-17 Dineína citoplásmica y transporte de organelos por proteínas motoras seguidoras de microtúbulos. *a*) Estructura de una molécula de dineína citoplásmica, que contiene dos cabezas pesadas de dineína y varias cadenas intermedias y ligeras más pequeñas en la base de la molécula. Cada cadena pesada de dineína contiene una cabeza globular grande generadora de fuerza, un pedúnculo con un sitio de unión para el microtúbulo, y un tallo. *b*) Esquema de dos vesículas que se mueven en sentidos opuestos a lo largo del mismo microtúbulo, una impulsada por cinesina hacia el extremo más del riel y la otra por dineína citoplásmica que la mueve hacia el extremo menos del riel. En el modelo mostrado, cada vesícula contiene ambos tipos de proteínas motoras, pero las moléculas de cinesina se desactivan en la vesícula superior y las moléculas de dineína se desactivan en la vesícula inferior. Ambas proteínas motoras están unidas a la membrana de la vesícula mediante un intermediario; la cinesina puede unirse a las vesículas mediante diversas proteínas integrales y periféricas de membrana, y la dineína lo hace por medio de un complejo proteínico soluble llamado dinactina. *c*) Esquema del transporte de vesículas, agregados vesiculotubulares (VTC) y organelos mediados por cinesina y por dineína en una célula cultivada no polarizada.

túbulo situado en la punta. La proyección más larga, conocida como pie (o cola), vincula las cadenas intermedias y ligeras, cuyas funciones no están bien definidas. Análisis estructurales indican que el dominio motor de la dineína consiste en varios módulos distintos organizados en forma de rueda (véase fig. 9-36), lo cual lo hace fundamentalmente distinto de cinesina y miosina tanto en arquitectura como en modo de operación.

Las pruebas de motilidad in vitro señalan que la dineína citoplásmica se mueve de manera progresiva a lo largo del microtúbulo hacia el extremo menos del polímero, contrario al sentido de la cinesina (fig. 9-17*b*). Se cuenta con evidencia que sugiere que la dineína citoplásmica tiene por lo menos dos funciones:

1. Un agente generador de fuerza para el posicionamiento del huso y el movimiento de los cromosomas durante la mitosis (descrita en el capítulo 14).
2. Un motor microtubular dirigido al extremo menos para situar el aparato de Golgi y para el movimiento de organelos, vesículas y partículas por el citoplasma.

En las células nerviosas, se cree que la dineína citoplásmica participa en el movimiento retrógrado de organelos citoplásmicos y el movimiento anterógrado de los microtúbulos. En los fibroblastos y otras células no neurales, se supone que la dineína citoplásmica transporta organelos membranosos de sitios periféricos hacia el centro de la célula (fig. 9-17*c*). El cargamento trasladado por la dineína incluye endosomas y lisosomas, las vesículas provenientes del retículo endoplásmico que se dirigen al aparato de Golgi y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) que se transporta al núcleo de una célula infectada. La dineína citoplásmica no interactúa de modo directo con el cargamento limitado por la membrana, sino que necesita un adaptador con múltiples subunidades llamado *dinactina*. También es posible que la dinactina regule la actividad de la dineína y ayude a unir la proteína motora con el microtúbulo, lo cual incrementa la capacidad de proceso.

De acuerdo con el modelo presentado en la figura 9-17*c*, que tal vez sea demasiado simplista, la cinesina y la dineína citoplásmica mueven materiales similares en sentidos contrarios por la misma red de rieles. Como se indica en la figura 9-17*b*, los organelos individuales pueden unirse con la cinesina y la dineína

al mismo tiempo, aunque se presume que sólo una de ellas se activa a la vez. Como se explica en la página 366, es probable que la miosina también se encuentre en algunos de estos organelos.

Centros organizadores de microtúbulos

La función de un microtúbulo dentro de una célula viva depende de su localización y de su orientación, lo que marca la importancia de comprender por qué un microtúbulo se ensambla en un sitio y no en otro. Cuando se estudia in vitro, el ensamble de microtúbulos con tubulina alfa-beta ocurre en dos fases distintas: una fase lenta de *nucleación*, en la que al principio se forma una pequeña parte del microtúbulo, y una fase mucho más rápida de *elongación*. A diferencia de lo que sucede in vitro, la nucleación de los microtúbulos es un fenómeno rápido dentro de la célula, donde ocurre en relación con diversas estructuras especializadas llamadas **centros de organización de microtúbulos** (o **MTOC**, por sus siglas en inglés). El MTOC mejor estudiado es el centrosoma.

Centrosomas En las células animales la nucleación de los microtúbulos del citoesqueleto se desarrolla en el **centrosoma**, una estructura compleja que contiene dos **centriolos** con forma de barril rodeados por **material pericentriolar** (o **PCM**, del inglés *pericentriolar material*) el cual es electrodenso y amorfo (fig. 9-18*a*, *b*). Los centriolos son estructuras cilíndricas de unos 0.2 μm de diámetro y casi siempre miden lo doble de largo. Contienen nueve fibrillas espaciadas de manera uniforme; en el corte transversal cada una de ellas se ve como una banda de

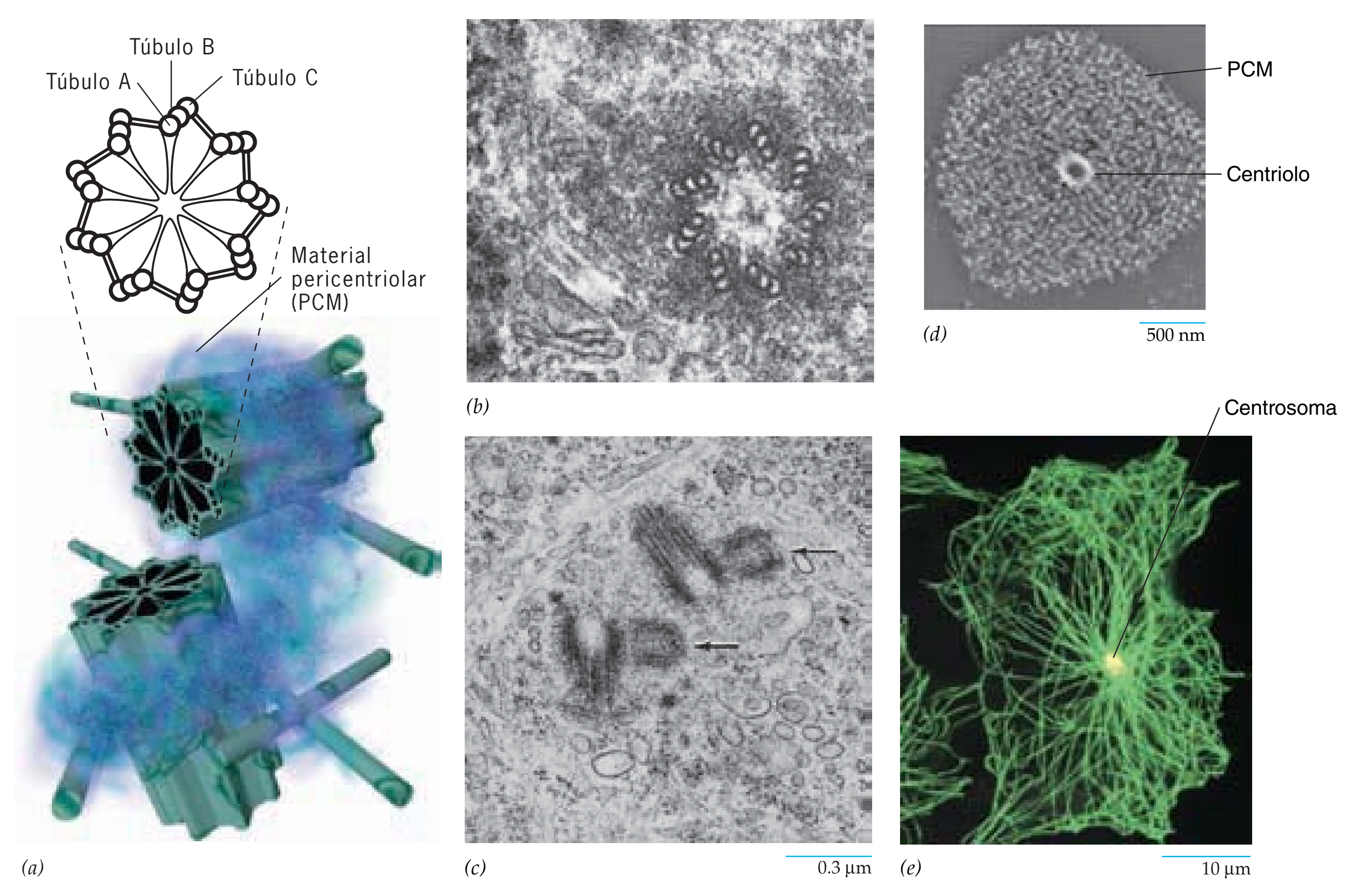


FIGURA 9-18 El centrosoma. *a*) Diagrama esquemático de un centrosoma que muestra centriolos en pares, el material pericentriolar circundante (PCM) y los microtúbulos que surgen del PCM, donde la nucleación ocurre. *b*) Micrografía electrónica de un corte transversal de un centriolo que muestra la disposición en rueda con rayos de las nueve fibrillas periféricas, cada una consistente en un microtúbulo completo y dos incompletos. *c*) Micrografía electrónica que muestra dos pares de centriolos. Cada par consiste en un centriolo original más largo y un centriolo hijo más pequeño (flecha) que se alarga en esta fase del ciclo celular (se describe en la sección 14.2). *d*) Reconstrucción micrográfica electrónica de un centrosoma extraído con yoduro de potasio 1.0 M, que muestra que el PCM consiste en una celosía fibrosa de organización laxa. *e*) Micrografía por fluorescencia de una célula cultivada de mamífero que muestra el centrosoma (teñido de amarillo por un anticuerpo contra una proteína del centrosoma) en el centro de una red microtubular extensa. (*A*, TOMADA DE S. J. DOXSEY ET AL., CELL 76:643, 1994; CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS; *B*, CORTESÍA DE B. R. BRINKLEY; *C*, TOMADA DE J. B. RATTNER Y STEPHANIE G. PHILLIPS, J CELL BIOL 57:363, 1973; *D*, TOMADA DE BRADLEY J. SCHNACKENBERG ET AL., CORTESÍA DE ROBERT E. PALAZZO, PROC NAT'L ACAD SCI U.S.A. 95:9298, 1998; *E*, TOMADA DE TOSHIRO OHTA, ET AL., J CELL BIOL 156:88, 2002, CORTESÍA DE RYOKO KURIYAMA; *C* Y *E*, MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

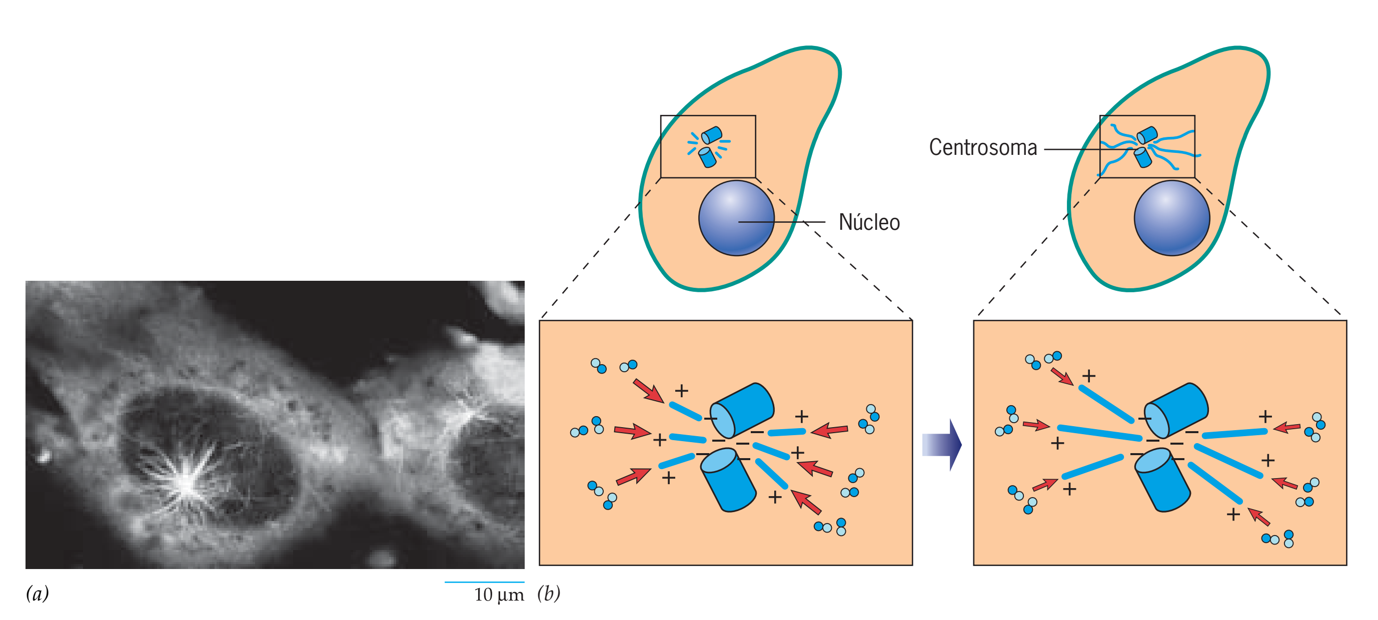


FIGURA 9-19 Nucleación del microtúbulo en el centrosoma. *a*) Micrografía de fluorescencia de un fibroblasto cultivado que se expuso a colcemida para inducir el desensamble de los microtúbulos y luego se permitió que se recuperara durante 30 min antes del tratamiento con anticuerpos fluorescentes contra tubulina. La estructura estelar brillante marca el centrosoma, un centro organizador de microtúbulos (MTOC) del que comenzaron a crecer microtúbulos recién armados en todas direcciones. *b*) Esquema del nuevo crecimiento de los microtúbulos que muestra la adición de subunidades en el extremo más del polímero lejos del centrosoma. (*A*, TOMADA DE MARY OSBORN Y KLAUS WEBER. PROC NAT'L ACAD SCI, U.S.A. 73:869, 1976.)

tres microtúbulos, designados túbulos A, B y C. Sólo el túbulo A es un microtúbulo completo (fig. 9-18*a*, *b*) y está conectado con el centro del centriolo mediante un rayo radial. Los tres microtúbulos de cada tripleta se disponen con un patrón que confiere al centriolo una apariencia característica de rueda de espigas. Por lo general los centriolos se encuentran en pares, con ambos elementos situados en ángulo recto entre sí (fig. 9-18*a*, *c*). La extracción de centrosomas aislados con yoduro de potasio 1.0 M retira cerca de 90% de la proteína del material pericentriolar y deja un andamiaje de fibras insolubles parecidas al espagueti (fig. 9-18*d*). Como se explica más adelante, el centrosoma es el principal sitio de inicio de los microtúbulos en las células animales y por lo general permanece en el centro de la red microtubular de la célula (fig. 9-18*e*).

La figura 9-19*a* ilustra un experimento inicial que demuestra la participación del centrosoma en el inicio y la organización del citoesqueleto microtubular. Primero se rompieron los polímeros de los microtúbulos de una célula animal cultivada mediante la incubación de las células con colcemida, un fármaco que se une con las subunidades de tubulina y bloquea su utilización en la célula. El reensamble del microtúbulo se vigiló mediante eliminación del producto químico, y tratando a las células fijadas, a distintos intervalos de tiempo con anticuerpos fluorescentes contra tubulina. Unos cuantos minutos después de la eliminación de las condiciones inhibidoras se observan una o dos manchas fluorescentes en el citoplasma de cada célula. Tras 15 a 30 min (fig. 9-19*a*), el número de filamentos marcados que irradian de estos focos aumenta en forma drástica. Cuando estas mismas células se cortan y examinan con un microscopio electrónico se ve que los microtúbulos recién formados irradian del centrosoma hacia afuera. Un examen más minucioso revela que en realidad los microtúbulos no penetran en el centrosoma ni hacen contacto con los centriolos, sino que terminan en el material pericentriolar denso que se encuentra en la periferia del centrosoma. Este material es el que inicia la formación de los microtúbulos (véase fig. 9-20*c*). Aunque los centriolos no participan de manera directa en la nucleación del microtúbulo, es probable que desempeñen una función en el reclutamiento de la materia pericentriolar durante el ensamble del centrosoma y en el proceso general de la duplicación del centrosoma (descrito en la sección 14.2).

Según se ilustra con el experimento recién descrito, los centrosomas son los sitios de nucleación del microtúbulo. La polaridad de estos microtúbulos siempre es la misma: el extremo menos se relaciona con el centrosoma y el extremo más (o creciente) se sitúa en la punta contraria (fig. 9-19*b*). Por ello, aunque los núcleos de los microtúbulos se formen en el MTOC, se alargan en el extremo contrario del polímero. El extremo creciente de un microtúbulo puede contener un conjunto de proteínas diferentes que ayudan a unir el microtúbulo con un blanco particular, como un endosoma o cisterna de Golgi en una célula en interfase, o un cromosoma condensado en una célula en mitosis.

La fracción de microtúbulos que permanecen relacionados con el centrosoma varía mucho de un tipo celular a otro. El centrosoma de una célula no polarizada (p. ej., un fibroblasto) suele situarse cerca del centro de la célula y permanece vinculado con los extremos menos de una gran cantidad de microtúbulos (como en la figura 9-18*e*). En cambio, muchos de los microtúbulos de una célula epitelial polarizada se anclan por sus extremos menos en sitios dispersos cercanos al extremo apical de las células, ya que sus extremos más se dirigen hacia la superficie basal de la célula (fig. 9-1). Asimismo el axón de una célula

nerviosa contiene grandes cantidades de microtúbulos que no tienen relación con el centrosoma, que se localiza en el cuerpo celular de la neurona. Estos microtúbulos axónicos se cortan del centrosoma donde se formaron y luego se transportan al axón por medio de proteínas motoras. Ciertas células animales, como los oocitos de los ratones, carecen de centrosomas y aun así son capaces de formar estructuras microtubulares complejas, como el huso meiótico (como se explica en el capítulo 14).

Cuerpos basales y otros MTOC Los centrosomas no son los únicos MTOC de las células. Los microtúbulos externos de un cilio o flagelo se generan a partir de microtúbulos en una estructura llamada **cuerpo basal**, que se encuentra en la base del cilio o flagelo (véase fig. 9-32). Los cuerpos basales tienen una estructura idéntica a los centriolos; de hecho los cuerpos basales y los centriolos pueden dar origen uno al otro. Por ejemplo, el cuerpo basal donde se origina el flagelo de un espermatozoide proviene de un centriolo que formó parte del huso meiótico del espermatocito del que proviene el espermatozoide. Por el contrario, el cuerpo basal del espermatozoide casi siempre se convierte en centriolo durante la primera división mitótica del huevo fertilizado.

Las células vegetales carecen de centrosomas y centriolos, o cualquier otro tipo de MTOC evidente. En cambio, en una célula vegetal los microtúbulos están concentrados alrededor de la superficie del núcleo y dispersos en la corteza (fig. 9-22).

Nucleación del microtúbulo Sin importar su apariencia tan diversa, todos los MTOC tienen funciones similares en todas las células: controlan el número de microtúbulos, su polaridad, el número de protofilamentos que constituyen sus paredes y el momento y la localización de su ensamble. Además, todos los MTOC comparten un componente proteico, un tipo de tubulina descubierta a mediados del decenio de 1980 llamada **tubulina gamma**. A diferencia de las tubulinas alfa y beta que constituyen cerca de 2.5% de la proteína de una célula no neural, la tubulina gamma representa sólo 0.005% del total de proteínas de la célula. Los anticuerpos fluorescentes contra tubulina gamma tiñen todos los tipos de MTOC, inclusive el material pericentriolar de los centrosomas (fig. 9-20*a*), lo que sugiere que esta tubulina es un componente crucial en la nucleación de los microtúbulos. Esta conclusión se apoya con otros estudios. Por ejemplo, la microinyección de anticuerpos contra tubulina gamma en una célula viva bloquea el reensamble de microtúbulos después de su despolimerización mediante fármacos o frío.

Para comprender el mecanismo de la nucleación de microtúbulos los investigadores se enfocaron en la estructura y la composición del material pericentriolar (PCM) en la periferia

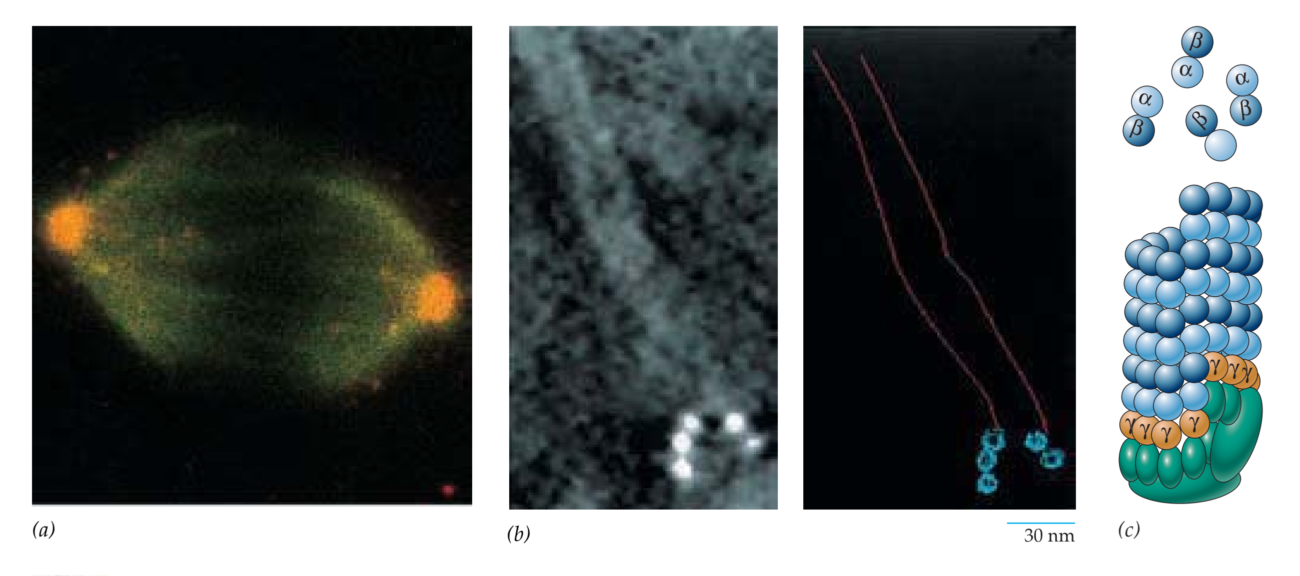


FIGURA 9-20 Participación de la tubulina gamma en la función del centrosoma. *a*) Fibroblasto en división que se tiñó mediante técnica doble con anticuerpos contra tubulina gamma (rojo) y contra tubulina beta (verde). La tinción naranja se debe a la coincidencia de los dos tipos de tubulina, que ocurre en los dos centrosomas localizados en los polos opuestos de una célula en proceso de división. *b*) Reconstrucción basada en micrografías electrónicas de una porción de un centrosoma que se incubó in vitro con tubulina purificada y luego se marcó con anticuerpos contra tubulina gamma. Los anticuerpos se unieron con partículas de oro para hacerlos visibles (como puntos blancos) en la reconstrucción. Durante la incubación con tubulina, el centrosoma sirvió como un MTOC para formar el núcleo de los microtúbulos cuyos extremos menos se ven marcados con cúmulos de oro, a menudo dispuesto en semicírculos o anillos. El dibujo anexo muestra el esbozo del microtúbulo que se presenta en la micrografía. *c*) Un modelo para la función de la tubulina gamma durante el ensamble de los microtúbulos. La nucleación comienza cuando los dímeros de tubulina alfa-beta se unen con un anillo abierto de moléculas de tubulina gamma (café), que se mantienen en su sitio mediante varias proteínas más (verde) que constituyen la gran γ-TuRC. La nucleación mediante γ-TuRC define la polaridad del microtúbulo con un anillo de monómeros de tubulina alfa situados en el extremo menos de la estructura. (*A*, Cortesía de M. Katherine Jung y Berl R. Oakley; *B*, reproducida con autorización de Michelle Moritz et al., Nature 378:639, 1995. Foto cortesía de David A. Agard; derechos reservados 1995 por Macmillan Magazines Limited.)

de los centrosomas. Se cree que las fibras insolubles del PCM (fig. 9-18*d*) sirven como sitios de unión para las estructuras anulares que tienen el mismo diámetro que los microtúbulos (25 nm) y contienen tubulina gamma. Estas estructuras anulares se descubrieron cuando los centrosomas se purificaron e incubaron con anticuerpos marcados con oro que se unían con la tubulina gamma. Con el microscopio electrónico se observó que las partículas de oro se aglomeraban en semicírculos o anillos situados en los extremos menos de los microtúbulos (fig. 9-20*b*). Éstos son los extremos de los microtúbulos que están incluidos en el PCM del centrosoma donde la nucleación ocurre. Se aislaron complejos anulares similares de tubulina gamma (o γ-*TuRC*) de extractos celulares y se demostró que permiten la nucleación del ensamble de microtúbulos in vitro. Éstos y otros estudios sugieren el modelo que se muestra en la figura 9-20*c* en el que un conjunto helicoidal de subunidades de tubulina gamma (café) forman un molde anular sobre el que la primera hilera de dímeros de tubulina alfa-beta se ensambla. En este modelo sólo la tubulina alfa del heterodímero puede unirse con un anillo de subunidades gamma. Por tanto el γ-TuRC determina la polaridad de todo el microtúbulo y también forma una capa en su extremo menos.

Las propiedades dinámicas de los microtúbulos

Aunque todos los microtúbulos tienen una morfología muy similar, presentan diferencias marcadas en su estabilidad. Los microtúbulos son estabilizados por la presencia de MAP unidas (pág. 334) y por ciertas modificaciones postraduccionales (p. ej., acetilación), de las subunidades de tubulina. Los microtúbulos del huso mitótico o del citoesqueleto son muy lábiles y esto significa que son sensibles para desarmarse. Los microtúbulos de las neuronas maduras son mucho menos lábiles y los de los centriolos, cilios y flagelos son muy estables. Las células vivas pueden someterse a diversos tratamientos que desarman los microtúbulos del citoesqueleto sin romper otras estructuras celulares. El desensamble puede inducirse con frío, presión hidrostática, aumento en la concentración de Ca^{2+} y diversos productos químicos, como la colquicina, la vinblastina, la vincristina, el nocodazol y la podofilotoxina. El fármaco taxol detiene las actividades dinámicas de los microtúbulos a través de un mecanismo muy diferente. El taxol se une con el polímero del microtúbulo, lo que inhibe su desensamble e impide que la célula ensamble las nuevas estructuras microtubulares necesarias. Muchos de estos compuestos, aun el taxol, se usan en la quimioterapia contra el cáncer porque destruyen las células tumorales en forma preferencial. Durante años se supuso que las células tumorales eran muy sensibles a estos fármacos por el alto ritmo de división celular. No obstante, la investigación reciente reveló que aún hay más. Como se explica en el capítulo 14, las células normales tienen un mecanismo (o punto de revisión) que detiene la división celular en presencia de fármacos que alteran el huso mitótico, como la vinblastina y el taxol. Como resultado las células normales suelen detener sus actividades de división hasta que el fármaco se elimina del cuerpo. En cambio, muchas células cancerosas carecen de este punto de revisión mitótico e intentan completar su división inclusive en ausencia de un huso mitótico funcional. Esto suele conducir a la muerte de la célula tumoral.

La labilidad de los microtúbulos del citoesqueleto refleja el hecho de que son polímeros formados por enlace no covalente de bloques diméricos de construcción. Por lo general los microtúbulos del citoesqueleto están sujetos a despolimerización y repolimerización conforme los requerimientos de la célula cambian de un momento a otro. El carácter dinámico del citoesqueleto microtubular está bien ilustrado en las células vegetales. Si una célula vegetal típica se vigila desde una división mitótica hasta la siguiente, aparecen cuatro conjuntos distintos de microtúbulos, uno después del otro (fig. 9-21).

1. Durante la mayor parte de la interfase los microtúbulos de una célula vegetal se distribuyen por toda la corteza, como se muestra en la etapa 1 de la figura 9-21. Una búsqueda de la tubulina γ revela que este factor de nucleación se localiza a lo largo de los microtúbulos corticales, lo cual sugiere que los nuevos microtúbulos podrían formarse directamente en la superficie de los ya existentes. Esta idea es apoyada por estudios sobre la incorporación de tubulina en células vivas

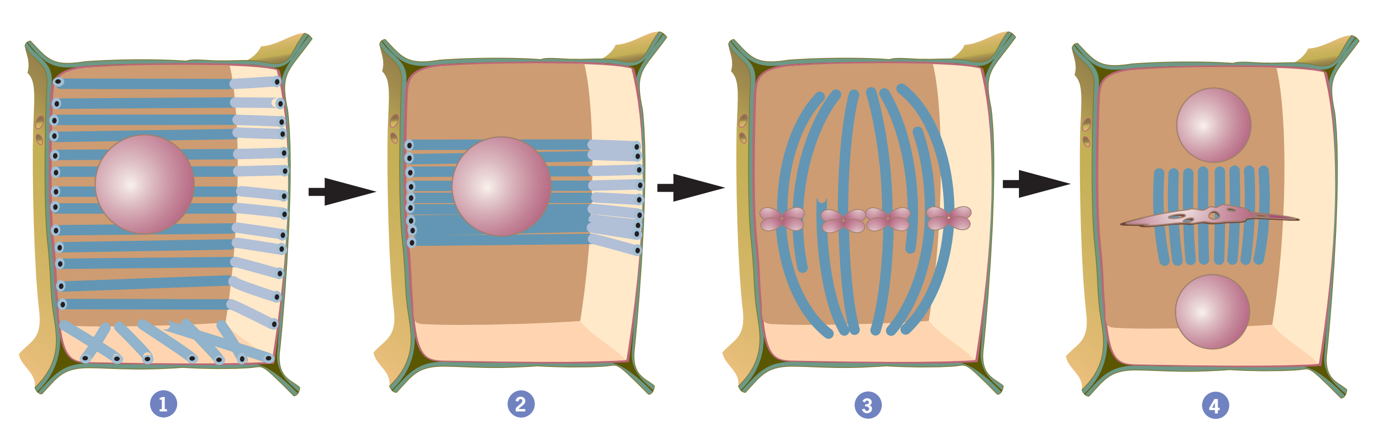
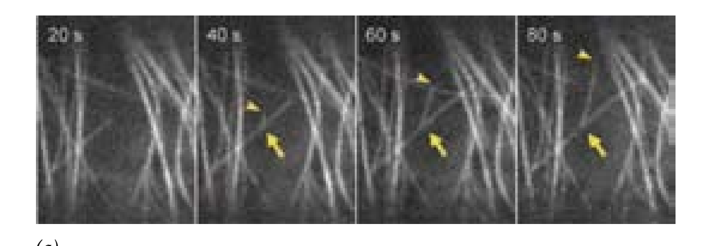
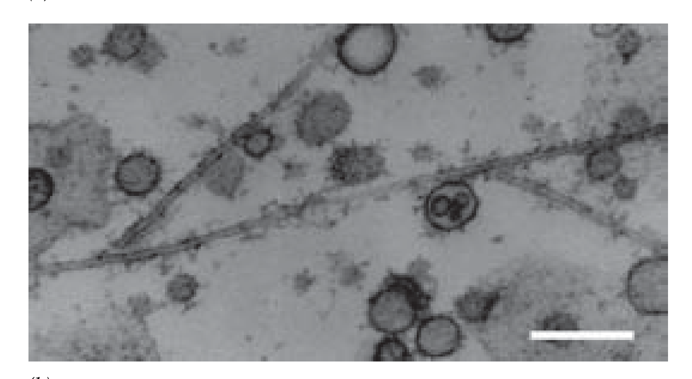


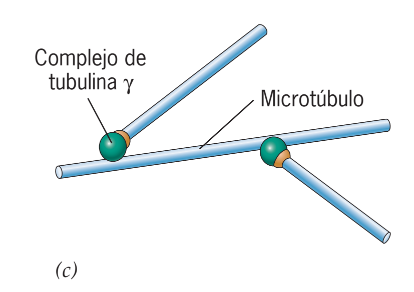
FIGURA 9-21 Cuatro disposiciones principales de los microtúbulos presentes durante el ciclo celular de una célula vegetal. La organización de los microtúbulos en cada etapa se describe en el texto. (TOMADA DE R. H. GODDARD ET AL., PLANT PHYSIOL 104:2, 1994.)



(a)



(b)



(c)

FIGURA 9-22 Nucleación de túbulos corticales vegetales. *a*) Las micrografías muestran una porción de una célula de tabaco cultivada viva que expresa tubulina marcada con tubulina-GFP. Durante el periodo de observación, un microtúbulo ya existente de la corteza sirve como núcleo para el ensamblaje de un microtúbulo hijo, que crece hacia afuera formando una rama en forma de "Y". El extremo de un microtúbulo recién formado se indica por una punta de flecha, y el punto de ramificación mediante una flecha. *b*) Micrografía electrónica de un microtúbulo con dos microtúbulos hijos que ramifican desde su superficie. Los microtúbulos ramificados se ensamblaron en un sistema acelular que contenía subunidades de tubulina. La barra representa 10 μm. *c*) Modelo esquemático que muestra cómo se forman microtúbulos nuevos en los sitios de tubulina γ presentes en la superficie de un microtúbulo preexistente. (*A*, *B*, TOMADAS DE TAKASHI MURATA, ET AL., REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE NATURE CELL BIOL. 7:961, 2005. COPYRIGHT 2005, MACMILLAN MAGAZINES LTD.)

(fig. 9-22*a*) y por ensayos in vitro que muestran microtúbulos recién formados de manera perpendicular a los lados de otros ya existentes. Una vez formados, es probable que los microtúbulos hijos se desprendan del progenitor y sean incorporados en los haces paralelos que circundan la célula (figs. 9-12*a*, 9-21).

2. Conforme la célula se aproxima a la mitosis, los microtúbulos desaparecen de la mayor parte de la corteza y dejan sólo una banda transversal llamada *banda preprofase*, que rodea la célula como un cinturón (fig. 9-21, etapa 2). La banda preprofase marca el sitio del futuro plano de división.
3. A medida que la célula progresa hacia la mitosis, la banda preprofase se pierde y los microtúbulos reaparecen en la forma de huso mitótico (fig. 9-21, etapa 3).
4. Después de que los cromosomas se separan, el huso mitótico desaparece y se sustituye por un haz de microtúbulos llamado *fragmoplasto* (fig. 9-21, etapa 4), que desempeña una función central en la formación de la pared celular que separa las dos células hijas (véase fig. 14-38).

Se cree que estos cambios drásticos en la organización espacial de los microtúbulos se logran mediante la combinación de dos mecanismos separados: 1) un nuevo arreglo de los microtúbulos existentes y 2) el desensamble de los microtúbulos existentes con un reensamble de otros nuevos en regiones distintas de la célula. En este último caso, los microtúbulos que constituyen la banda preprofase se forman a partir de las mismas subunidades que unos minutos antes eran parte de la matriz cortical o, antes que eso, el fragmoplasto.

La información de los factores que influyen en el ritmo de crecimiento y reducción de los microtúbulos proviene sobre todo de estudios del ensamble y el desensamble de microtúbulos in vitro.

Estudio de la dinámica del microtúbulo in vitro La primera estrategia exitosa respecto al ensamble de microtúbulos in vitro fue obra de Richard Weisenberg de la *Temple University* en 1972. Al razonar que los homogeneizados celulares deben tener todas las macromoléculas necesarias para el proceso de ensamble, Weisenberg logró la polimerización de tubulina en homogeneizados completos de cerebro a 37°C con la adición de Mg^{2+}, GTP y EGTA (que se une con Ca^{2+}, un inhibidor de la polimerización). Weisenberg encontró que los microtúbulos podrían desensamblarse y ensamblarse de nuevo una y otra vez con el solo descenso e incremento de la temperatura en la mezcla de incubación. La figura 9-23 muestra tres microtúbulos que se armaron en el tubo de ensayo a partir de tubulina purificada. Puede verse que uno de los tres microtúbulos contiene sólo 11 protofilamentos (como su diámetro menor lo indica). No resulta inesperado que los microtúbulos armados in vitro tengan cantidades anormales de protofilamentos porque carecen del molde apropiado (fig. 9-20*c*) que en condiciones normales proporcionan los complejos anulares de tubulina gamma in vivo. El ensamble in vitro de microtúbulos se favorece mucho con la adición de MAP o con fragmentos de microtúbulos o estructuras que los contengan (fig. 9-24), que sirven como moldes para la adición de subunidades libres. En estos estudios in vitro se agregan subunidades de tubulina sobre todo al extremo más del polímero existente.

Desde los primeros estudios in vitro se estableció que el ensamble de microtúbulos requiere GTP. El ensamble de dímeros de tubulina demanda la unión de una molécula de GTP con la subunidad de tubulina beta.[2] La incorporación real del dímero al final de un microtúbulo no necesita hidrólisis de GTP, sino que el GTP se hidroliza poco *después* que el dímero se incorpora

[2] Una molécula de GTP también se une con la subunidad tubulina alfa, pero no es intercambiable y no se hidroliza después de la incorporación de la subunidad. Las posiciones de los nucleótidos de guanina en el heterodímero de tubulina alfa-beta se muestran en la figura 9-8*c*.

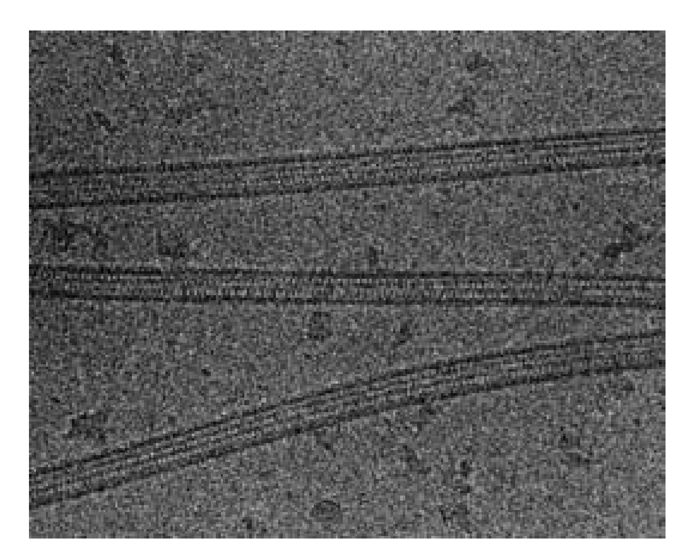


FIGURA 9-23 Microtúbulos ensamblados en un tubo de ensayo. Micrografía electrónica de microtúbulos congelados no fijados que se polimerizaron in vitro. Pueden verse los protofilamentos individuales y sus subunidades de tubulina globular. Nótese que la parte media de los tres microtúbulos contiene sólo 11 protofilamentos. (CORTESÍA DE R. H. WADE, INSTITUT DE BIOLOGIE STRUCTURALE, GRENOBLE, FRANCIA.)

a un microtúbulo y el GDP resultante permanece unido con el polímero armado. Luego que un dímero se libera de un microtúbulo durante el desensamble e ingresa a la reserva soluble, el GDP se sustituye con un GTP nuevo. Este intercambio de nucleótido "recarga" el dímero y permite que sirva de nuevo como bloque de construcción para la polimerización.

Debido a que la hidrólisis del GTP incluye el ensamble de un microtúbulo, esta no es una actividad celular barata. ¿Por qué se desarrolló una vía de polimerización tan costosa? Para responder esta pregunta es conveniente considerar el efecto de la hidrólisis del GTP en la estructura del microtúbulo. Cuando un microtúbulo crece, el extremo más se ve al microscopio electrónico como una hoja abierta a la que se agregan dímeros-GTP (paso 1, fig. 9-25). Durante las fases de crecimiento rápido del microtúbulo los dímeros de tubulina se agregan con más rapidez de lo que su GTP puede hidrolizarse. Se cree que la presencia de

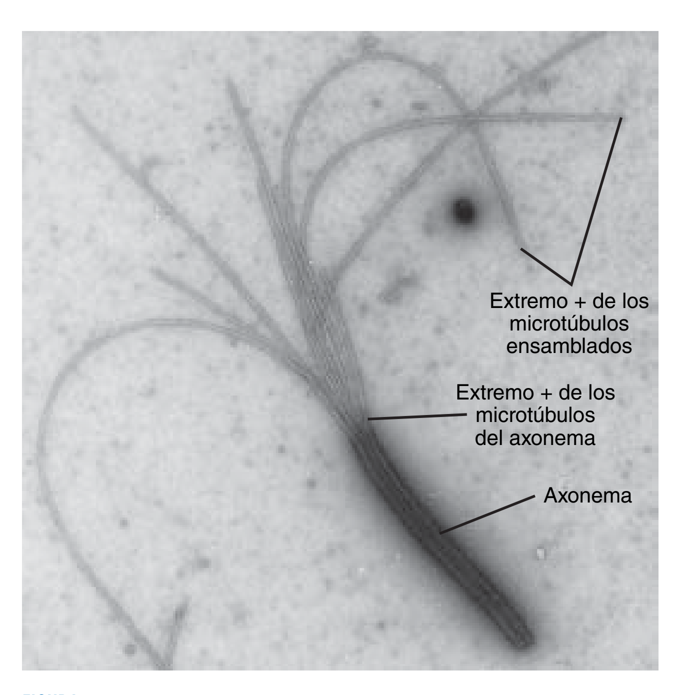


FIGURA 9-24 Ensamble de la tubulina en las estructuras microtubulares existentes. Micrografía electrónica que muestra el ensamble in vitro de la tubulina cerebral en los extremos más de los microtúbulos de un axonema del flagelo de *Chlamydomonas.* (CORTESÍA DE L. I. BINDER Y JOEL L. ROSENBAUM.)

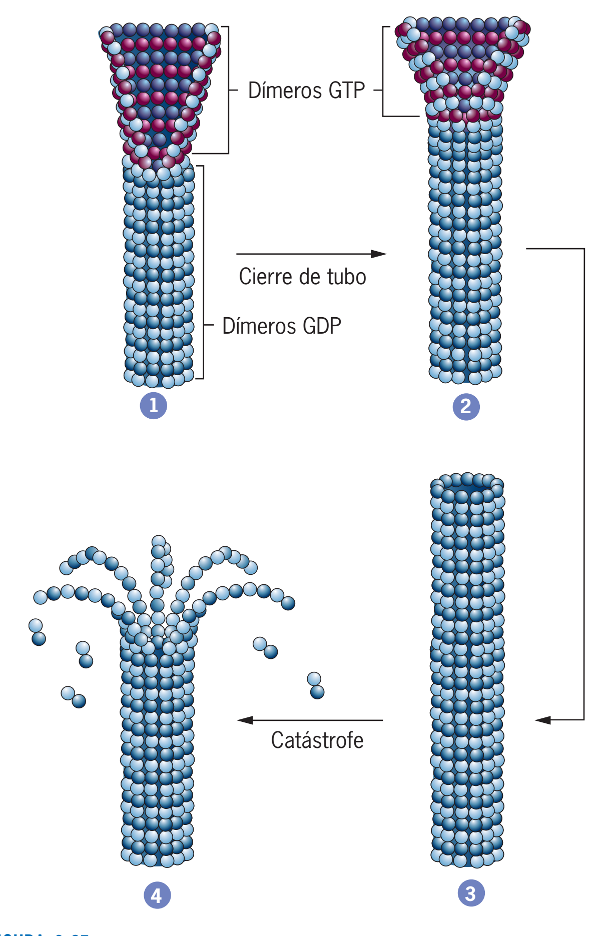


FIGURA 9-25 Modelo de tapa estructural de inestabilidad dinámica. De acuerdo con el modelo, el crecimiento o encogimiento de un microtúbulo depende del estado de los dímeros de tubulina en la punta del microtúbulo. Los dímeros de tubulina-GTP se muestran en rojo. Los dímeros de tubulina-GDP se presentan en azul. En un microtúbulo en crecimiento (paso 1), la punta consiste en una hoja abierta que contiene subunidades de tubulina-GTP. En el paso 2, el tubo comenzó a cerrarse, lo que obliga a la hidrólisis del GTP unido. En el paso 3, el tubo ya se cerró hasta su extremo, lo que dejó sólo subunidades tubulina-GDP. Las subunidades tubulina-GDP tienen una conformación curva comparada con sus contrapartes unidas con GTP, lo que las hace menos capaces de ajustarse en un protofilamento recto. La tensión resultante de la presencia de subunidades de tubulina-GDP en el extremo del microtúbulo se libera conforme los protofilamentos curvados salen hacia afuera del túbulo y experimentan encogimiento catastrófico (paso 4). (TOMADA DE A. A. HYMAN Y E. KARSENTI, CELL 84:402, 1996, CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS.)

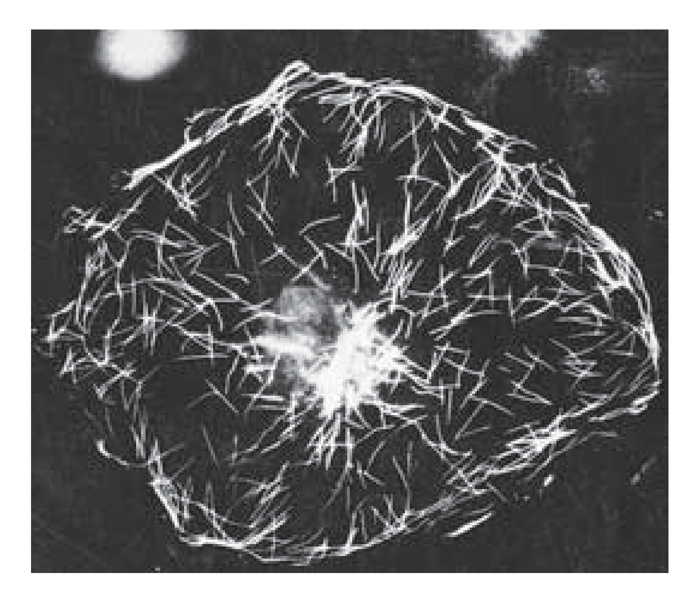
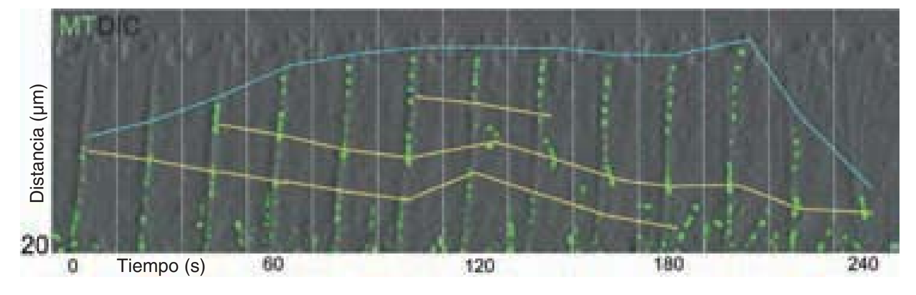


FIGURA 9-26 Dinámica del microtúbulo en las células vivas. A este fibroblasto cultivado se le inyectó un pequeño volumen de tubulina que se había unido mediante enlaces covalentes con biotina, una pequeña molécula cuya localización en la célula es fácil de determinar mediante anticuerpos fluorescentes contra biotina. Cerca de un minuto después de la inyección, las células se fijaron y se identificó la localización de la tubulina unida con biotina que se había incorporado en microtúbulos insolubles. En esta micrografía de fluorescencia resulta evidente que, aun durante periodos tan cortos como 1 min, muchas subunidades de tubulina se incorporan en los extremos crecientes de los microtúbulos del citoesqueleto. (Tomada de Marc Kirschner, J. Cell Biol 102, portada del núm. 3, 1986, mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

una capa de dímeros tubulina-GTP en los extremos más de los protofilamentos favorece la adición de más subunidades, con el crecimiento consecuente del microtúbulo. Sin embargo, se supone que los microtúbulos con extremos abiertos, como en el paso 1 de la figura 9-25, experimentan una reacción espontánea que conduce al cierre del tubo (pasos 2 y 3). En este modelo el cierre del tubo se acompaña de hidrólisis del GTP unido, lo que genera subunidades que contienen tubulina unida con GDP. Las subunidades GDP-tubulina tienen una conformación distinta a sus precursores GTP-tubulina y son menos adecuadas para ajustarse en un protofilamento recto. La tensión mecánica resultante disminuye la estabilidad del microtúbulo. La energía de tensión se libera cuando los protofilamentos se curvan hacia afuera en el extremo más del túbulo y se someten a polimerización catastrófica (paso 4). Por tanto, pareciera que la hidrólisis del GTP es un elemento fundamental de la calidad dinámica de los microtúbulos. La energía de tensión almacenada en un microtúbulo como resultado de la hidrólisis del GTP los torna inestables y capaces de desarmarse poco después de su formación (en ausencia de otros factores estabilizadores como las MAP). Los microtúbulos pueden encogerse con gran rapidez, sobre todo in vivo, lo que permite a la célula desarmar su citoesqueleto microtubular en muy poco tiempo.

Estudio de la dinámica de los microtúbulos in vivo La microinyección de tubulina con marca fluorescente en una célula cultivada puede revelar el carácter dinámico del citoesqueleto microtubular dentro de una célula. Las subunidades marcadas se incorporan con rapidez en los microtúbulos preexistentes del citoesqueleto, aun en ausencia de cambios morfológicos (fig. 9-26). Si se observan microtúbulos individuales con el microscopio de fluorescencia, parecen crecer despacio por cierto periodo y luego se encogen con rapidez y en forma inesperada, como lo ilustra la vigilancia del microtúbulo de la figura 9-27. Puesto que el encogimiento ocurre de manera más rápida e inesperada que la elongación, la mayoría de los microtúbulos desaparece de la célula en cuestión de minutos y se sustituye por microtúbulos nuevos que crecen a partir del centrosoma.

En 1984, Timothy Mitchison y Marc Kirschner, de la *University of California* en San Francisco, propusieron que el comportamiento de los microtúbulos podía explicarse por un fenómeno que llamaron **inestabilidad dinámica**. Inestabilidad dinámica se refiere al hecho de que los microtúbulos en crecimiento y encogimiento pueden coexistir en la misma región de una célula, y que un microtúbulo determinado puede cambiar en uno u otro sentido de modo impredecible entre las fases de crecimiento y acortamiento, como se ve en la figura 9-27. La inestabilidad dinámica es una propiedad del extremo más del microtúbulo; se agregan subunidades al extremo más durante el crecimiento y se pierden del extremo menos durante el encogimiento. Además, las células contienen un conjunto de diversas proteínas (llamadas +TIP) que se une con los extremos dinámicos más de los microtúbulos y regula tanto la velocidad de crecimiento o encogimiento como la frecuencia de interconversión entre las dos fases.



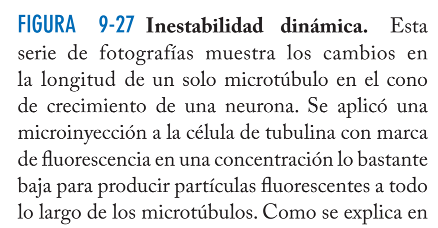


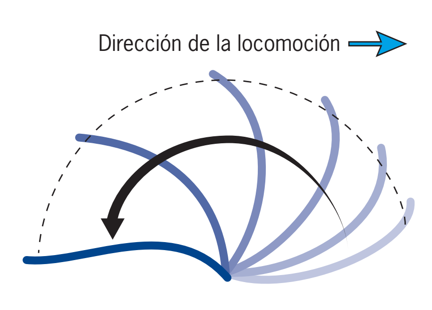
FIGURA 9-27 Inestabilidad dinámica. Esta serie de fotografías muestra los cambios en la longitud de un solo microtúbulo en el cono de crecimiento de una neurona. Se aplicó una microinyección a la célula de tubulina con marca de fluorescencia en una concentración lo bastante baja para producir partículas fluorescentes a todo lo largo de los microtúbulos. Como se explica en la página 331, estas partículas brindan puntos de referencia fijos que pueden seguirse en el tiempo. Cada una de las líneas amarillas horizontales conecta una de estas partículas de un punto de tiempo al siguiente. La línea azul indica el extremo más aproximado del microtúbulo en diferentes puntos de tiempo. Desde 0 hasta cerca de 200 s, el microtúbulo presenta la adición gradual de subunidades de tubulina en el extremo más. Luego, desde alrededor de 200 a 240 s, el microtúbulo experimenta un encogimiento rápido. (Tomada de Andrew W. Schaefer, Nurul Kabir y Paul Forscher, J Cell Biol 158:145, 2002 mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

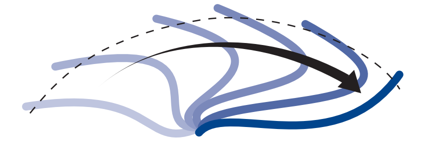
La inestabilidad dinámica constituye un mecanismo por medio del cual los extremos positivos de los microtúbulos pueden explorar rápidamente el citoplasma en busca de sitios de fijación apropiados. La fijación estabiliza temporalmente los microtúbulos y permite a la célula construir las complejas redes citoesqueléticas que se exponen en este capítulo. La inestabilidad dinámica también permite a las células reaccionar rápidamente a las condiciones cambiantes que requieren remodelación del citoesqueleto microtubular. Uno de los ejemplos más notables de tal remodelación se presenta en la mitosis, cuando los microtúbulos del citoesqueleto se desensamblan y remodelan en un huso mitótico bipolar. Esta reorganización se relaciona con un intenso cambio en la estabilidad microtubular; los microtúbulos de las células en interfase tienen una semivida cinco a 10 veces mayor que la de las células mitóticas. A diferencia de los microtúbulos del huso mitótico o el citoesqueleto, los de los organelos que se consideran a continuación carecen de actividad dinámica y, al contrario, son muy estables.

Cilios y flagelos: estructura y función

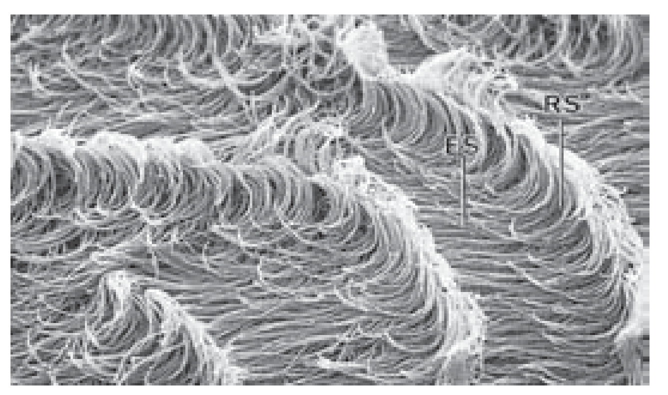
Cualquiera que haya colocado una gota de agua de un estanque bajo la lente del microscopio y haya intentado impedir que un protozoario nadara fuera del campo de visión puede apreciar la actividad de los cilios y los flagelos. Los **cilios** y los **flagelos** son organelos móviles similares a pelos que sobresalen de la superficie de diversas células eucariotas. Las bacterias también tienen estructuras conocidas como *flagelos*, pero los flagelos de los procariotas son filamentos simples sin relación evolutiva con sus contrapartes eucariotas (véase fig. 1-14). La explicación siguiente se refiere sólo a los organelos eucariotas.

En esencia los cilios y los flagelos son la misma estructura. La mayoría de los biólogos usa uno u otro término con base en el tipo de célula del cual el organelo se proyecta y su patrón de movimiento. De acuerdo con esta distinción, un cilio puede compararse con un remo que mueve la célula en sentido perpendicular al cilio mismo. Durante su golpe de poder el cilio se mantiene rígido (fig. 9-28*a*) mientras empuja contra el medio circundante. En su movimiento de recuperación el cilio se vuelve flexible y ofrece poca resistencia al medio. Los cilios tienden a encontrarse en grandes cantidades sobre la superficie celular y su actividad suele ser coordinada (fig. 9-28*b*). Los cilios mueven líquido y partículas a través de diversas vías en los organismos pluricelulares (fig. 9-28*c*). Por ejemplo, en los humanos el epitelio ciliado que recubre las vías respiratorias impulsa el moco y los detritos atrapados en él para alejarlos de los pulmones. No todos los cilios son móviles; muchas células del cuerpo tienen un solo cilio inmóvil (*cilio primario*) y se cree que desempeña una función sensorial al vigilar las propiedades de los líquidos extracelulares. Algunas de las funciones de los cilios únicos móviles e inmóviles se explican en el recuadro Perspectiva humana.





(*a*)



(*b*) 10 µm

(*c*) 3.5 µm

FIGURA 9-28 Golpe ciliar. *a*) Diversas etapas del golpe de un cilio. *b*) Los cilios de la superficie de un protozoario ciliado se mueven en ondas metácronas en las que los cilios de una hilera determinada están en la misma etapa del ciclo del movimiento, pero los que se encuentran en filas adyacentes están en una etapa diferente. RS, cilios en golpe de recuperación; ES, cilios en golpe de poder efectivo. *c*) Cilios de la superficie del labio (fimbria) del oviducto de ratón. (*B*, reimpresa con autorización de G. A. Horridge y S. L. Tamm, Science 163:818, 1969; © derechos reservados 1969, American Association for the Advancement of Science; *C*, cortesía de Ellen R. Dirksen.)

PERSPECTIVA HUMANA

La función de los cilios en el desarrollo y la enfermedad

Cuando una persona se mira al espejo ve un organismo relativamente simétrico, uno cuya mitad izquierda es una imagen en espejo de la derecha. Por otra parte, los cirujanos ven organismos muy asimétricos cuando abren la cavidad torácica o abdominal de una persona. Por ejemplo, el estómago, el corazón y el bazo están desviados al lado izquierdo del cuerpo, mientras que el hígado se localiza en el lado derecho. En ocasiones algún médico encuentra un paciente en el que la asimetría entre los lados derecho e izquierdo de las vísceras está invertida (situación conocida como *situs inversus*).

El *situs inversus* se presenta en personas con el síndrome de Kartagener, que también se caracteriza por infecciones respiratorias y sinusales recurrentes, e infertilidad en los varones. Los primeros indicios de la causa subyacente de este trastorno se obtuvieron en el decenio de 1970, cuando se descubrió que los espermatozoides inmóviles de estas personas tenían una estructura anormal del axonema. Según el paciente, los axonemas pueden carecer de las ramas externas o internas de dineína, de microtúbulos centrales o de las estructuras radiales (véase fig. 9-30). Estudios posteriores mostraron que este trastorno se debe a mutaciones en varios genes, inclusive los que codifican las cadenas pesadas e intermedias de dineína. Es comprensible que estas personas sufran infecciones respiratorias, lo que depende de la eliminación de detritos y bacterias por acción de los cilios del epitelio respiratorio, e infertilidad masculina, pero ¿por qué casi la mitad de ellos tiene inversión de la asimetría izquierda-derecha?

El plan corporal básico de un mamífero se establece durante la gastrulación gracias a una estructura llamada *nodo embrionario.* Cada célula que forma parte del nodo posee un solo cilio. Estos cilios tienen propiedades inusuales; carecen de los dos microtúbulos centrales (el axonema tiene una estructura 9 + 0) y presentan un movimiento rotatorio peculiar. Si la motilidad de estos cilios se altera, como sucede en los ratones con mutaciones en un gen de la dineína flagelar, casi la mitad de los animales presenta inversión de la asimetría, lo que sugiere que el azar determina la asimetría entre izquierda y derecha en estos mutantes.

La rotación de los cilios nodales mueve el líquido circundante al lado izquierdo de la línea media del embrión, como se demostró mediante el seguimiento del movimiento de las cabezas fluorescentes microscópicas. Se propuso que el líquido extracelular movido por los cilios nodales contiene sustancias morfogenéticas (sustancias que dirigen el desarrollo embrionario) que se concentran al lado izquierdo del embrión, lo que conduce a la formación final de diferentes órganos a ambos lados de la línea media. Esta proposición se apoya en estudios experimentales en los que se desarrollaron embriones de ratones en cámaras miniaturizadas en las que podía imponerse un flujo artificial de líquido a través del nodo. Cuando los embriones se sometieron al flujo de líquido en dirección contraria a la que ocurre durante el desarrollo normal, los embriones desarrollaron la asimetría izquierda-derecha invertida.[a]

Muchas células del cuerpo tienen un solo cilio primario inmóvil. Durante años los investigadores ignoraron estos cilios, pero estudios recientes sugieren que desempeñan funciones importantes como "antenas" que perciben las propiedades químicas y mecánicas de los líquidos en los que se proyectan. Considérense los cilios primarios (fig. 1) de las células epiteliales que recubren la luz de los túbulos renales microscópicos en los que se forma la orina. La importancia de estos cilios se evidenció tras el descubrimiento de que un par de proteínas de membrana llamadas policistinas se localizan en la superficie de estos cilios renales, donde forman un canal de iones Ca^{2+}. Las mutaciones en *PKD1* y *PKD2*, los genes que codifican las policistinas, causan enfermedad renal poliquística, en la que los riñones desarrollan múltiples quistes que destruyen la función renal. Se cree que la PKD resulta de pérdida de la regulación de la división celular, porque los quistes se deben a un nivel anormalmente alto de proliferación de las células epiteliales que

FIGURA 1 Cilios primarios. Micrografía electrónica de barrido que muestra cada una de estas células del epitelio renal con un solo cilio primario inmóvil. (Tomada de R. G. Kessel y R. H. Kardon, Tissues and Organs: A Textbook of Scanning Electron Microscopy/Visuals Unlimited.)

[a] Una hipótesis alterna pero relacionada es que el nodo embrionario contiene dos tipos distintos de cilios, una población de cilios localizada en el centro del nodo y nodos primarios inmóviles distribuidos alrededor de la periferia del nodo. Conforme a esta hipótesis, los cilios móviles generan el flujo a la izquierda y los cilios inmóviles actúan como estructuras sensoriales que detectan el movimiento y transmiten señales que ocasionan asimetría.

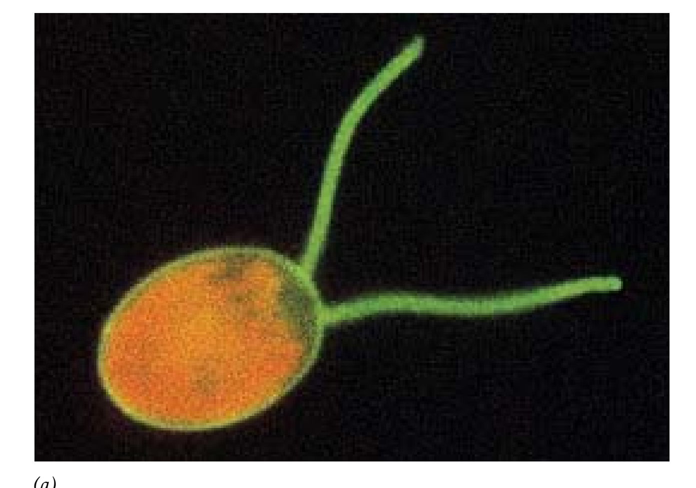
recubren partes de los túbulos renales. Se piensa que las mutaciones en las policistinas alteran la respuesta de los cilios primarios al flujo de líquido, lo que ocasiona un trastorno en el flujo de calcio a través de la membrana ciliar; esto a su vez altera la transmisión de señales al cuerpo de la célula y el núcleo, de lo que resulta una proliferación celular anormal.

La importancia de los cilios en el desarrollo humano se ha hecho aún más evidente por la reciente revelación de que el síndrome de Bardet-Biedl (BBS) es causado por mutaciones en cualesquiera de varios genes que intervienen en el ensamblaje de cuerpos basales y cilios. Las personas con BBS presentan una notable gama de trastornos, que incluye polidactilia (dedos supernumerarios en manos o pies), *situs inversus*, obesidad, nefropatía, defectos cardiacos, retardo mental, anormalidades de genitales, degeneración retiniana, escasa discriminación olfatoria, diabetes e hipertensión arterial. El hecho de que todas estas alteraciones puedan rastrearse hasta anomalías en cuerpos basales y cilios ilustra la importancia general de estas estructuras en el desarrollo y el funcionamiento de los órganos. Muchos de los genes implicados en estos diversos trastornos ciliares ("ciliopatías") fueron identificados en organismos modelo como *Chlamydomonas* y *C. elegans*, lo cual constituye otro ejemplo de la importancia de la investigación básica en organismos no vertebrados para mejorar el conocimiento de la enfermedad humana.

Los flagelos tienen diversos patrones de movimiento (*ondas*), según el tipo celular. Por ejemplo, el alga unicelular que se presenta en la figura 9-29*a* se impulsa hacia el frente con las sacudidas de sus dos flagelos en forma asimétrica, semejante a la brazada de pecho de un nadador humano (fig. 9-29*b*). Esta misma alga puede empujarse a sí misma por el medio con un movimiento simétrico similar al del espermatozoide (mostrado en la figura 9-34). La concentración interna del ion de calcio regula el grado de asimetría del patrón de movimiento del alga.

La micrografía electrónica de un corte transversal de un cilio o un flagelo es una de las imágenes más familiares de la biología celular (fig. 9-30*a*). Toda la proyección ciliar o flagelar está cubierta por una membrana que se continúa con la membrana plasmática de la célula. El centro del cilio, llamado **axonema**, contiene un conjunto de microtúbulos que corre en sentido longitudinal por todo el organelo. Con raras excepciones, el axonema de un cilio o flagelo móvil consiste en nueve microtúbulos dobles periféricos que rodean un par de microtúbulos central. Esta misma estructura microtubular, que se conoce como "disposición 9 + 2", se observa en los axonemas desde los protistas hasta los mamíferos y sirve como otro de los muchos recordatorios de que todos los eucariotas vivos evolucionaron de un ancestro común. Todos los microtúbulos del axonema tienen la misma polaridad; sus extremos más se hallan en la punta de la proyección y los extremos menos, en la base. Cada pareja periférica consiste en un microtúbulo completo, el *túbulo A*, y un microtúbulo incompleto, el *túbulo B*; este último alberga 10 u 11 subunidades en lugar de las 13 usuales.

La estructura básica del axonema se describió por primera vez en 1952; Irene Manton lo hizo en las plantas y Don Fawcett y Keith Porter, en células animales. Algunos de los componentes menos evidentes se hicieron visibles conforme el poder de resolución de los microscopios electrónicos mejoró (fig. 9-30*b*). Se vio que los túbulos centrales están encerrados por proyecciones que forman la *vaina central*, que se conecta con los túbulos A de las parejas periféricas mediante un conjunto de *rayos radiales.* Las parejas están conectadas entre sí por un *puente entre parejas* formado por una proteína elástica, la nexina. La observación de un par de "brazos" (uno *interno* y uno *externo*), que se proyectan del túbulo A (fig. 9-30*a*) fue muy importante. Un corte longitudinal,


(*a*)

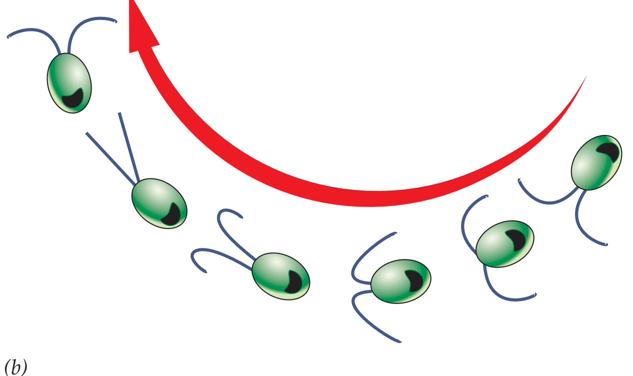
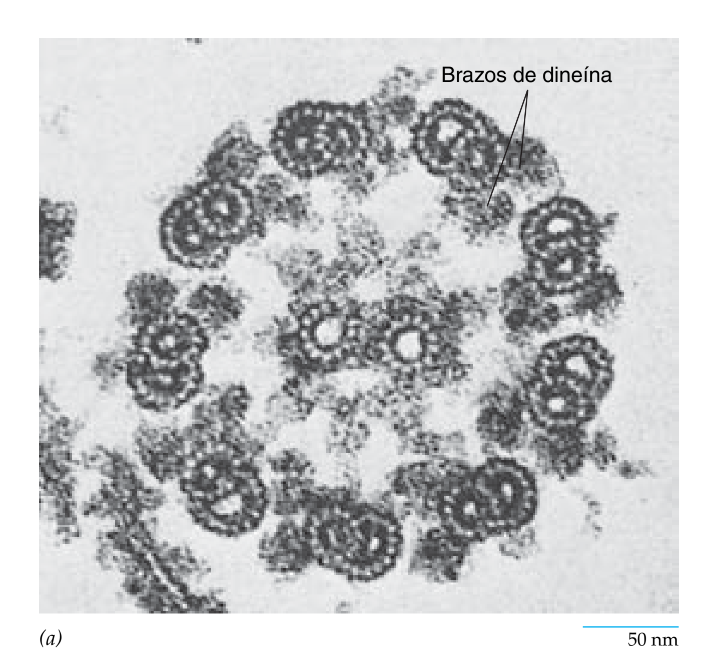

(*b*)

FIGURA 9-29 Flagelos eucariotas. *a*) Alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii.* Los dos flagelos se ven verdes después de unirse con un anticuerpo fluorescente dirigido contra una proteína mayor de membrana flagelar. El color rojo se debe a la autofluorescencia de la clorofila celular. A diferencia de muchos organismos flagelados, *Chlamydomonas* no necesitan sus flagelos para sobrevivir y reproducirse, por lo que pueden cultivarse cepas mutantes con varios tipos de defectos flagelares. *b*) El movimiento anterógrado de *Chlamydomonas* se realiza mediante una onda asimétrica que se parece a la brazada de pecho. En la figura 9-34 se muestra un tipo diferente de ondas flagelares. (*A*, CORTESÍA DE ROBERT BLOODGOOD, UNIVERSITY OF VIRGINIA.)



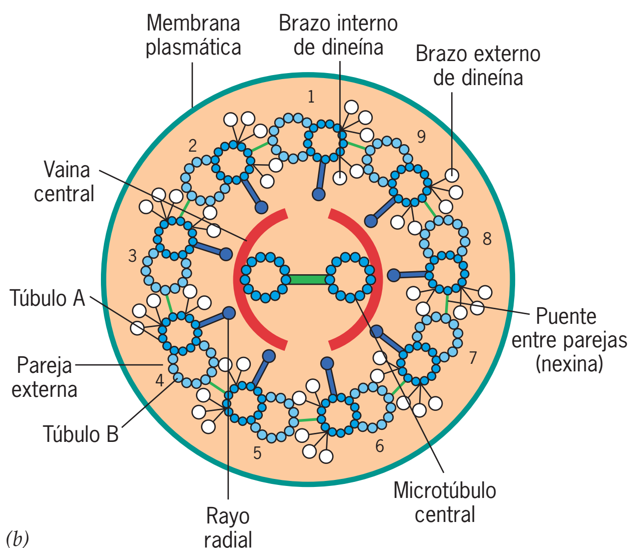
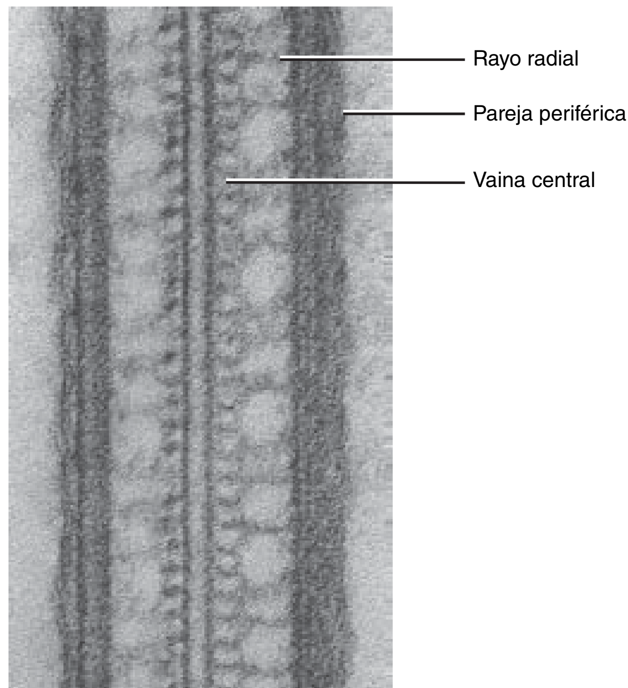


FIGURA 9-30 Estructura de un axonema ciliar o flagelar. *a*) Corte transversal del axonema de un espermatozoide. Se observa que las parejas periféricas consisten en un microtúbulo completo y otro incompleto, mientras que los dos microtúbulos centrales son completos. Los brazos de dineína se ven como proyecciones "borrosas" de la pared del microtúbulo completo. La estructura molecular de estos brazos se describe en una sección posterior. *b*) Esquema del axonema de un protista que muestra la estructura de las fibras microtubulares, los dos tipos de brazos de dineína (brazos externos de tres cabezas y brazos internos de dos cabezas), los vínculos de nexina entre las parejas, la vaina central que rodea los microtúbulos centrales y las espigas radiales que se proyectan de las parejas exteriores hacia la vaina central. (Nota: los cilios y flagelos de los animales casi siempre tienen brazos externos de dos cabezas.) (*A*, Cortesía de Lewis G. Tilney y K. Fujiwara.)



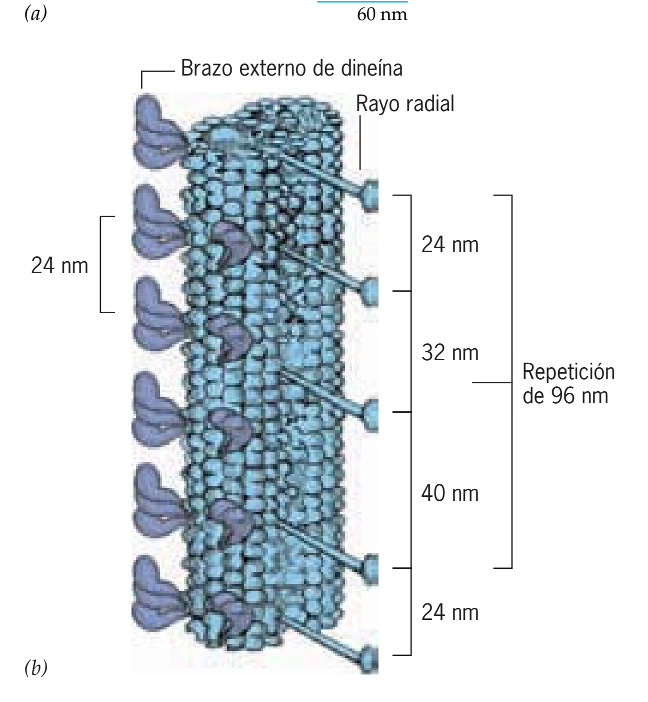


FIGURA 9-31 Vista longitudinal de un axonema. *a*) Micrografía electrónica de un corte longitudinal mediano de una región recta de un cilio. Puede verse que los rayos radiales unen la vaina central con el microtúbulo A de la pareja. *b*) Esquema de un corte longitudinal de una pareja flagelar. Los rayos radiales emergen en grupos de tres que se repiten (a intervalos de 96 nm en este caso) a lo largo del microtúbulo. Los brazos externos de dineína están espaciados a intervalos de 24 nm. (*A*, tomada de Fred D. Warner y Peter Satir, J Cell Biol 63:41, 1974; mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

o sea, uno que pasa por el axonema paralelo a su eje longitudinal, revela la naturaleza continua de los microtúbulos y la naturaleza discontinua de los otros elementos (fig. 9-31*a*).

Como se indicó antes, un cilio o flagelo surge de un *cuerpo basal* (fig. 9-32*a*) de estructura similar al centriolo de la figura 9-18*a*. Los túbulos A y B del cuerpo basal se elongan de las parejas del cilio o del flagelo (fig. 9-32*b*). Si un cilio o flagelo se arranca

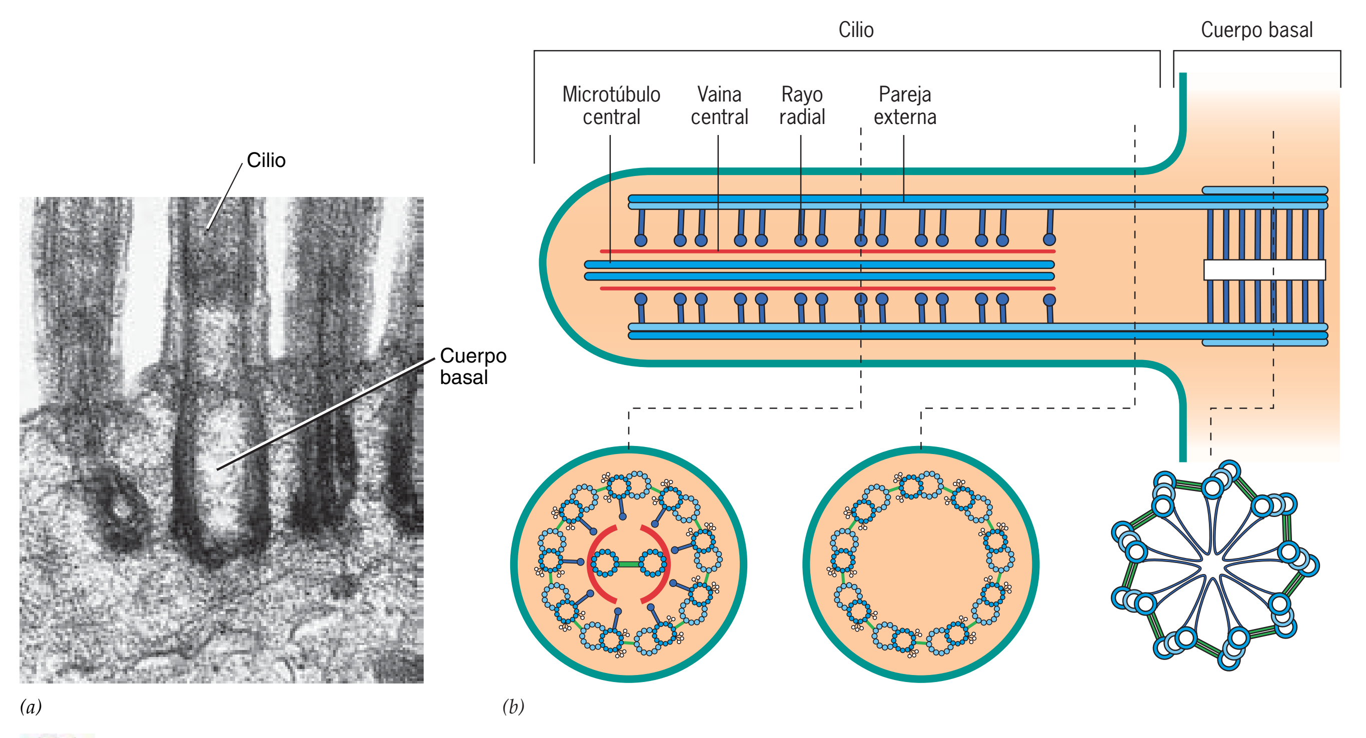
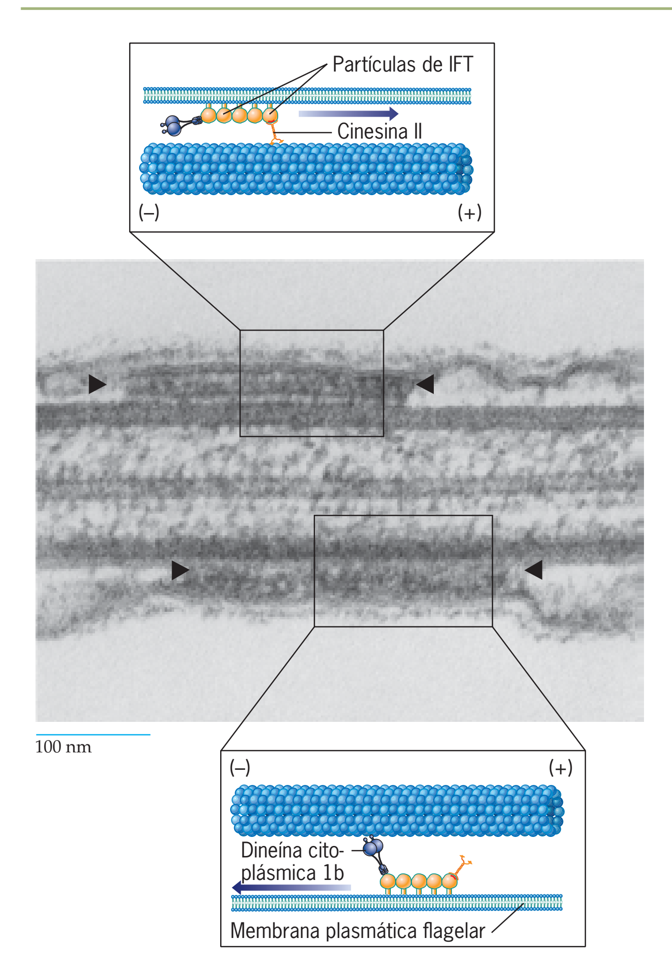


FIGURA 9-32 Cuerpos basales y axonemas. *a*) Micrografía electrónica de un corte longitudinal a través de los cuerpos basales de varios cilios en la superficie apical de las células epiteliales del oviducto de conejo. *b*) Esquema de la relación estructural entre los microtúbulos del cuerpo basal y el axonema de un cilio o flagelo. (*A*, CORTESÍA DE R. G. W. ANDERSON.)



de la superficie de una célula viva, un nuevo organelo se regenera como excrecencia del cuerpo basal. Como sucede con otras estructuras microtubulares, el crecimiento de un axonema ocurre en los extremos más (externos) de sus microtúbulos. ¿Cómo es que una célula organiza y mantiene un sitio de construcción en la punta externa del axonema situado a micras del cuerpo de la célula donde la síntesis de los materiales de construcción tiene lugar?

Aunque los biólogos han observado los flagelos de células vivas durante más de 100 años, fue hasta 1993 que los investigadores vieron el movimiento de las partículas en el espacio entre las parejas periféricas y la membrana plasmática circundante. Estudios posteriores revelaron un proceso conocido como **transporte intraflagelar** (**IFT**, del inglés *intraflagellar transport*), que se encarga de ensamblar y mantener estos organelos. El IFT depende del movimiento microtubular dirigido por la actividad de ambos extremos, más y menos (fig. 9-33). La cinesina II mueve los complejos de materiales de construcción a lo largo de proto-

FIGURA 9-33 Transporte intraflagelar (IFT). Micrografía electrónica de un corte longitudinal de un flagelo de *Chlamydomonas* que muestra dos hileras de partículas (limitadas por puntas de flecha) situadas entre las parejas externas de microtúbulos y la membrana plasmática flagelar. Como se ilustra en el recuadro, se cree que cada hilera de partículas se vincula con el microtúbulo de la pareja exterior mediante una proteína motora, ya sea dineína citoplásmica 1b si se mueven hacia la base del flagelo o cinesina II si las partículas se mueven hacia la punta del flagelo. (MICROGRAFÍA DE KEITH G. KOZMINSKI, ET AL., J CELL BIOL 131:1520, 1995, CORTESÍA DE JOEL L. ROSENBAUM, MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

filamentos de las parejas periféricas hasta el sitio de ensamble en la punta del axonema en crecimiento. Las moléculas de cinesina II (y las proteínas axonémicas recicladas) se transportan de regreso al cuerpo basal a lo largo de los mismos microtúbulos flagelares mediante un mecanismo impulsado por la dineína. Las mutaciones en cualquiera de los diferentes genes participantes en el transporte flagelar pueden tener consecuencias muy diversas, entre ellas la enfermedad renal y la ceguera.

Los brazos de dineína La maquinaria para la locomoción ciliar y flagelar se encuentra dentro del axonema. Esto se ilustra en el experimento mostrado en la figura 9-34, en la que el axonema de la cola de un espermatozoide, carente de la membrana que lo cubre, aún es capaz de efectuar movimientos sostenidos y normales en presencia de Mg^{2+} y ATP agregados. A mayor concentración de ATP, mayor frecuencia de los movimientos de estos organelos "reactivados".

Ian Gibbons de la *Harvard University* aisló la proteína que se encarga de la conversión de la energía química del ATP en energía mecánica de locomoción ciliar en el decenio de 1960. Los experimentos de Gibbons brindan un ejemplo elegante de la relación entre la estructura y la función en los sistemas biológicos, y los medios por los que la relación puede revelarse mediante el análisis experimental. Gibbons utilizó varias soluciones capaces de disolver distintos componentes y realizó la disección química de los cilios del protozoario *Tetrahymena* (fig. 9-35). En el paso 1 se muestra el corte transversal de un cilio intacto. La disección comenzó con la solución de la membrana plasmática en el detergente digitonina (paso 2). Los axonemas aislados de la fracción insoluble se sumergieron en una solución con EDTA, un compuesto que se une con iones divalentes y los retira (por quelación). Cuando los axonemas tratados con EDTA se examinaron bajo el microscopio electrónico, los túbulos centrales no estaban, lo mismo que los brazos que sobresalen de los túbulos A (paso 3). De manera simultánea con la pérdida de estas estructuras, los axonemas insolubles perdieron su capacidad para hidrolizar ATP, propiedad que el sobrenadante ganó. La ATP-asa encontrada en el sobrenadante era una proteína enorme (de hasta dos millones de daltones) que Gibbons denominó *dineína* (de las palabras *dyne*, que significa *"fuerza"*, y *proteína*). Esta proteína ahora se conoce como **dineína ciliar** (o **axonémica**) para distinguirla de la dineína citoplásmica, una proteína relacionada que participa en el transporte de organelos y partículas. Cuando las partes insolubles del axonema se mezclaron con la proteína soluble en presencia de Mg^{2+}, gran parte de la actividad de la ATP-asa se vinculó de nuevo con el material insoluble en la mezcla (paso 4). El examen de la fracción insoluble mostró que los brazos habían reaparecido en los túbulos A de los axonemas.

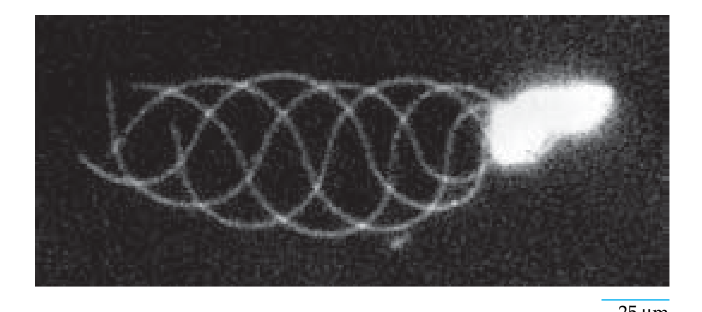


FIGURA 9-34 Espermatozoide de erizo marino reactivado con ATP 0.2 mM después de quitar la membrana con detergente Triton X-100. Esta micrografía de exposición múltiple se obtuvo con cinco destellos de luz y muestra el flagelo reactivado en diferentes etapas de su movimiento. (TOMADA DE CHARLES J. BROKAW Y T. F. SIMONICK, J CELL BIOL 75:650, 1977; MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

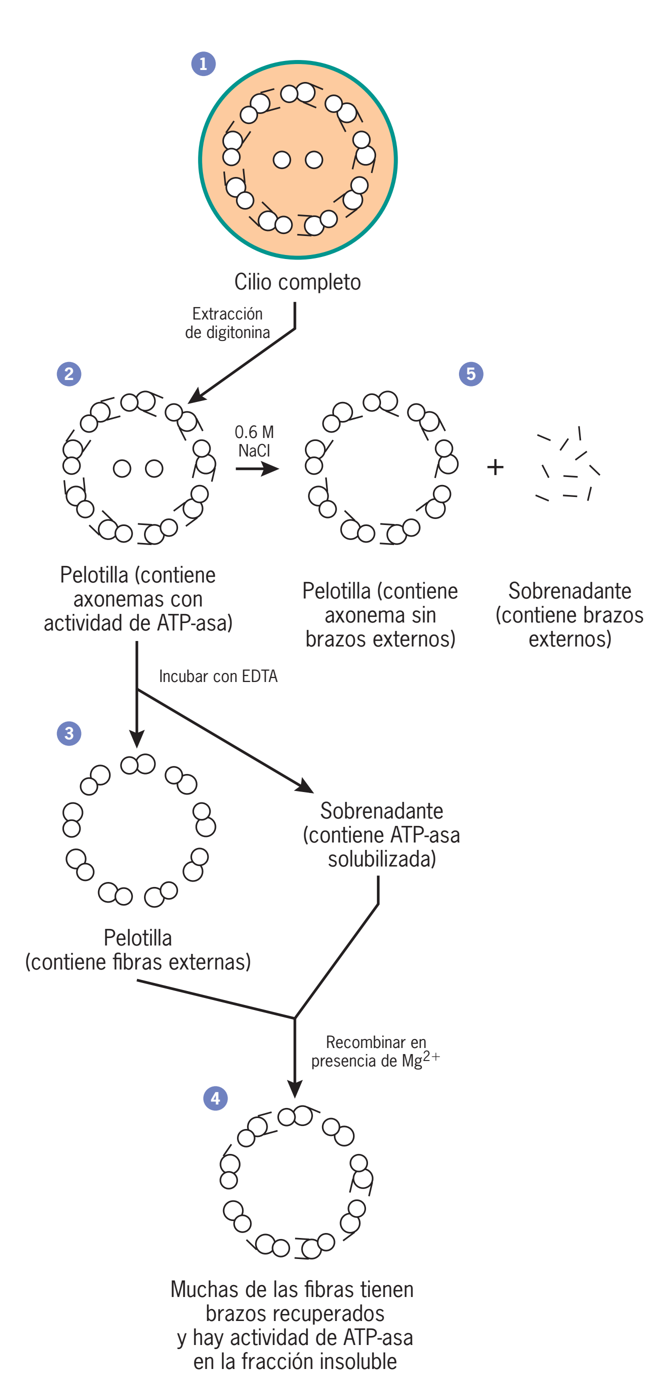


FIGURA 9-35 Pasos en la disección química de los cilios del protozoario *Tetrahymena*. Los pasos numerados se describen en el texto.

Gibbons concluyó que los brazos vistos en las micrografías eran equivalentes a las moléculas de ATP-asa de dineína recuperadas en la solución con EDTA, por lo que eran los brazos los que liberaban la energía necesaria para la locomoción.

En investigaciones posteriores se observó que el tratamiento de axonemas aislados de espermatozoides con solución alta en sal (0.6 M NaCl) eliminaba en forma selectiva los brazos externos y dejaba los internos en su sitio (paso 5). Cuando se agregaba ATP a los axonemas que carecían de los brazos externos, éstos se movían a la mitad de la velocidad del axonema intacto, aunque la onda era normal.

La figura 9-36*a* muestra una micrografía electrónica de la molécula de dineína externa (dineína del brazo externo) del axonema de *Tetrahymena*. Esta molécula de dineína consiste en tres cadenas pesadas y varias cadenas intermedias y ligeras. Como se describe en la página 340, cada cadena pesada de dineína está formada por un pie largo, una cabeza con forma de rueda y un tallo. La figura 9-36*b*, *c* presenta micrografías electrónicas de alta resolución de cadenas pesadas individuales de dineína de flagelos de *Chlamydomonas* preparados en dos condiciones distintas. Se cree que la diferencia en la conformación de las moléculas en estas dos micrografías (que se muestran en la figura 9-36*d*) representa el golpe de poder de la proteína motora dineína flagelar. El cambio en la conformación que se ilustra en la figura 9-36 sirve como fuerza básica de impulso para el movimiento ciliar o flagelar. Para comprender el mecanismo que permite este tipo de motilidad hay que reconsiderar la estructura del axonema.

El mecanismo de locomoción ciliar y flagelar Como se explica más adelante en este capítulo, la contracción muscular se debe al deslizamiento de los filamentos de actina sobre los filamentos adyacentes de miosina. La fuerza de deslizamiento se genera en los puentes cruzados semejantes a trinquetes que se encuentran en la cabeza de la molécula de miosina. Con el sistema muscular como modelo se propuso que el movimiento ciliar podía explicarse por el deslizamiento de parejas de microtúbulos adyacentes entre sí. De acuerdo con esta idea, los brazos de dineína mostrados en la figura 9-36 actúan como puentes balanceantes que generan las fuerzas necesarias para el movimiento ciliar o flagelar. La figura 9-37 presenta la secuencia de estos acontecimientos.

En el axonema intacto, el tallo de cada molécula de dineína (con sus cadenas intermedias y ligeras relacionadas) está anclado con firmeza a la superficie del túbulo A, con las cabezas globulares y los pies proyectados hacia el túbulo B de la pareja vecina. En el paso 1 de la figura 9-37, los brazos de dineína anclados en el túbulo A de la pareja inferior se adhieren a los sitios de unión del túbulo B de la pareja superior. En el paso 2, las moléculas de dineína experimentan un cambio en la conformación, o golpe de poder, que ocasiona el deslizamiento de la pareja inferior hacia el extremo basal de la pareja superior. Este cambio en la conformación de la cadena pesada de dineína se muestra en la figura 9-36*b* a *d*. En el paso 3, los brazos de dineína se desprendieron del túbulo B de la pareja superior. En el paso 4, los brazos se unieron de nuevo a la pareja superior para iniciar un nuevo ciclo (paso 4). (La figura 18-18 presenta una micrografía electrónica del corte transversal a través del cilio con los brazos de dineína de una pareja unidos a la pareja adyacente.)

El deslizamiento de un lado del axonema se alterna con el deslizamiento del otro lado, de manera que una parte del ci-

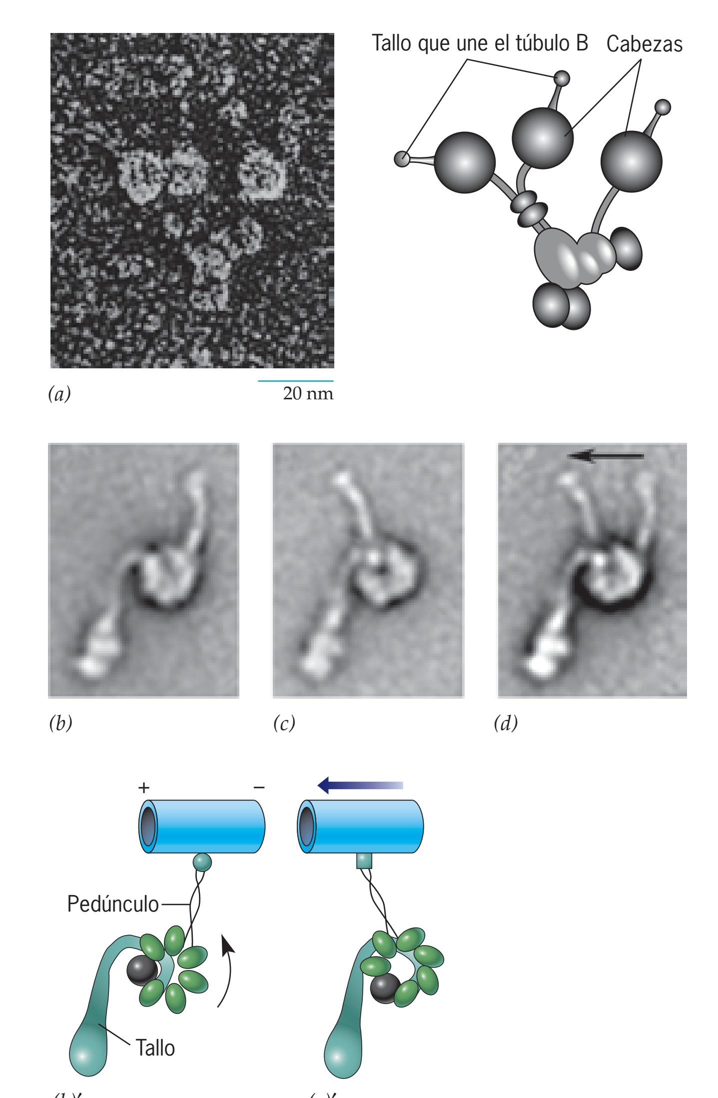


FIGURA 9-36 Estructura y función de la dineína flagelar o ciliar. *a*) Réplica en platino de una molécula de dineína flagelar del brazo externo rotatorio sombreado preparada mediante congelamiento rápido y grabado profundo para micrografía electrónica. Cada una de las tres cadenas pesadas forma una cabeza globular prominente con una extensión (tallo) que funciona para unir el brazo de dineína con la pareja vecina. A la derecha se muestra un dibujo para su interpretación. *b* a *d*) Micrografías de alta resolución (y modelos interpretativos) de la cadena pesada de la dineína flagelar antes (*b*) y después (*c*) de su golpe de poder. Se ve que giró el dominio motor, que consiste en varios módulos dispuestos en una rueda, lo que hizo que el extremo del tallo se moviera a la izquierda. La imagen que se muestra en *d* es una composición de una molécula que ilustra la posición del tallo antes y después del movimiento de poder. Este golpe de poder ocasiona que el microtúbulo unido con el tallo se deslice 15 nm hacia la izquierda en relación con el motor. Las pruebas de motilidad in vitro sugieren la posibilidad de que la dineína sea capaz de "cambiar de velocidad" a fin de dar pasos más cortos pero más potentes al mover una carga de masa creciente. (*A*, Cortesía de John E. Heuser y Ursula W. Goodenough; *B a D*, reproducidas con autorización de Stan A. Burgess, et al., Nature 421:717, 2003; Derechos reservados 2003 por Macmillan Magazines Limited.)

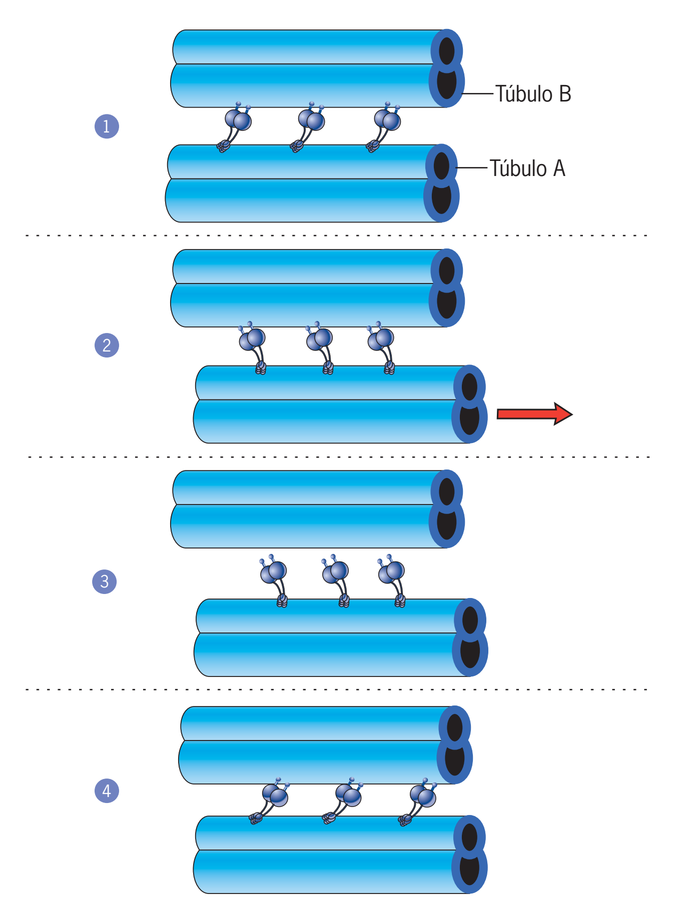


FIGURA 9-37 Representación esquemática de las fuerzas que impulsan la motilidad ciliar o flagelar. Los pasos se describen en el texto. En la figura previa se muestra una representación real del movimiento de poder.

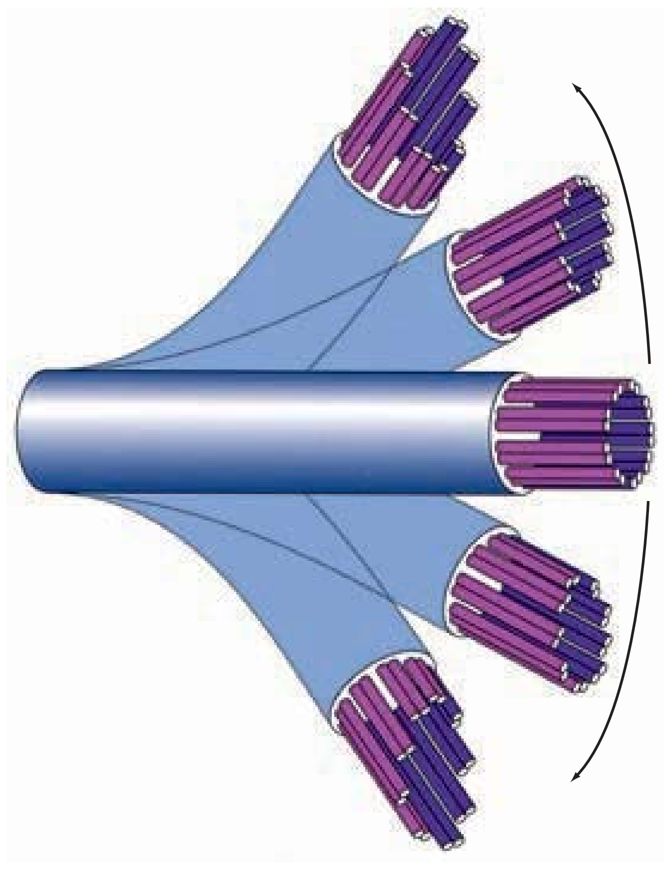


FIGURA 9-38 Mecanismo de microtúbulo deslizante de la motilidad ciliar o flagelar. Diagrama esquemático del deslizamiento de microtúbulos vecinos uno sobre el otro. Cuando el cilio está recto, todas las parejas externas terminan en el mismo nivel (*centro*). La flexión del cilio ocurre cuando las parejas del lado interno del doblez se deslizan sobre las del lado externo (*arriba* y *abajo*). La fuerza encargada del deslizamiento de los microtúbulos vecinos se mostró en las figuras previas. (TOMADA DE D. VOET Y J. G. VOET, BIOCHEMISTRY, 2ND ED. DERECHOS RESERVADOS © 1995 JOHN WILEY AND SONS, INC. REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE JOHN WILEY & SONS, INC.)

lio o flagelo se flexiona primero en una dirección y luego en la dirección contraria (fig. 9-38). Para esto es necesario que, en un momento determinado, los brazos de dineína de un lado del axonema estén activos, en tanto que los del otro lado están inactivos. Como resultado de esta diferencia en la actividad de la dineína, las parejas del lado interno del doblez (en las partes superior e inferior de la figura 9-38) se extienden más allá que las del lado contrario del axonema.

Se acumula evidencia constante en favor de la teoría de microtúbulo deslizante y de la función de los brazos de dineína. El deslizamiento del microtúbulo en los axonemas flagelares en movimiento se observó ya en forma directa, como lo ilustran las fotografías de la figura 9-39. En este experimento los axonemas aislados se incubaron con cuentas diminutas de oro que se unieron a la superficie externa expuesta de las parejas periféricas. Las cuentas sirvieron como marcadores fijos de sitios específicos en las parejas. Luego se vigiló la posición relativa de las cuentas mientras los axonemas se estimularon para moverse con la adición de ATP. Conforme los axonemas se doblaron a uno y otro lados, la distancia entre las cuentas de las distintas parejas aumentó y disminuyó en forma alternada (fig. 9-39), como era de esperar si las parejas vecinas se deslizaban de ida y vuelva una sobre la otra.

REVISIÓN ?

1. Describa tres funciones de los microtúbulos.
2. Contraste las funciones aparentes de la cinesina y la dineína citoplásmica en el transporte axónico.
3. ¿Qué es un centro organizador de microtúbulos (MTOC)? Describa la estructura de tres MTOC diferentes y cómo funciona cada uno de ellos.
4. ¿Qué función desempeña el GTP en el ensamble de los microtúbulos? ¿Qué significa el término “inestabilidad dinámica”? ¿Qué función cumple en la actividad celular?
5. Contraste los movimientos de un flagelo y un cilio. Describa el golpe de poder de una cadena pesada de la dineína. Describa el mecanismo por el que los cilios y los flagelos son capaces de efectuar sus movimientos de flexión.

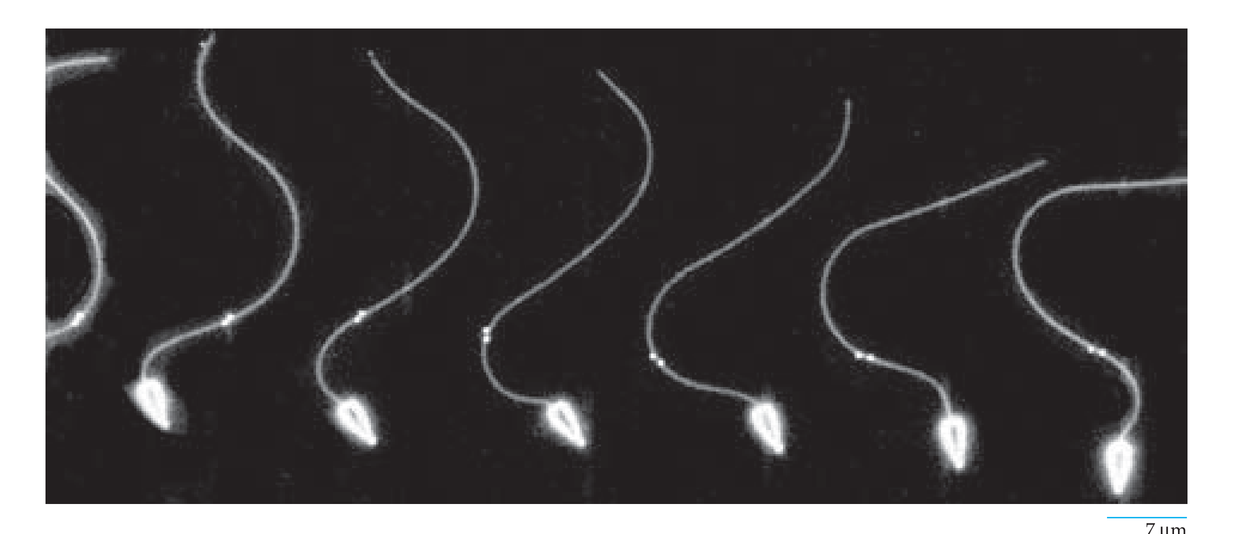


FIGURA 9-39 **Demostración experimental del deslizamiento de microtúbulos.** A algunos espermatozoides de erizo marino se les quitó la membrana, se reactivaron con ATP y se fotografiaron mediante la técnica de exposición múltiple, como en la figura 9-34. En este experimento se unieron cuentas de oro con los dobletes externos de microtúbulos expuestos, donde sirvieron como marcadores para sitios específicos a lo largo de distintos dobletes. Las posiciones relativas de las cuentas se vigilaron conforme el flagelo se movía. Como se muestra aquí, las cuentas se alejaron y luego se aproximaron mientras el flagelo ondulaba, lo que indicó que las parejas se deslizaban adelante y atrás unas sobre otras. (Tomada de Charles J. Brokaw, J Cell Biol 114, portada del núm. 6, 1991, mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

9.4 FILAMENTOS INTERMEDIOS

El segundo de los tres elementos del citoesqueleto se observa en el microscopio electrónico como filamentos sólidos y ramificados con un diámetro aproximado de 10 nm. Éstos se llamaron **filamentos intermedios** (o **IF**). Hasta ahora los filamentos intermedios sólo se identifican con certeza en las células animales. Los filamentos intermedios son fibras fuertes, similares a cuerdas, que proporcionan fuerza mecánica a las células que se someten a tensión física, como las neuronas, las células musculares y las células epiteliales que recubren las cavidades del cuerpo. Los IF se esparcen por el citoplasma de una gran variedad de células animales y a menudo se conectan con otros tipos de filamentos del citoesqueleto por medio de puentes delgados y frágiles (fig. 9-40). En muchas células los puentes consisten en una enorme proteína alargada llamada *plectina* que puede encontrarse en varias isoformas. Cada molécula de plectina tiene un sitio de unión para un filamento intermedio en un extremo y, según la isoforma, un sitio de unión para otro filamento intermedio, un microfilamento o un microtúbulo en el otro extremo.

A diferencia de los microfilamentos y los microtúbulos, los IF son un grupo químicamente heterogéneo de estructuras que en los humanos se codifica en más de 65 genes distintos. Las subunidades de polipéptidos de los IF pueden dividirse en seis clases principales con base en su distribución hística (cuadro 9-2), además de criterios bioquímicos, genéticos e inmunológicos. La mayoría, si no todos, de estos polipéptidos tiene una disposición similar de dominios que les permite formar filamentos semejantes. Lo más notable es que todos los polipéptidos de los IF contienen un dominio helicoidal alfa central y cilíndrico con longitud similar y secuencia homóloga de aminoácidos. Este dominio fibroso está flanqueado a ambos lados por dominios globulares de tamaño y secuencia variables (paso 1, fig. 9-41). Dos de estos polipéptidos interactúan en forma espontánea cuando sus cilindros helicoidales alfa se envuelven uno alrededor del otro en un rizo para formar un dímero parecido a una cuerda de unos

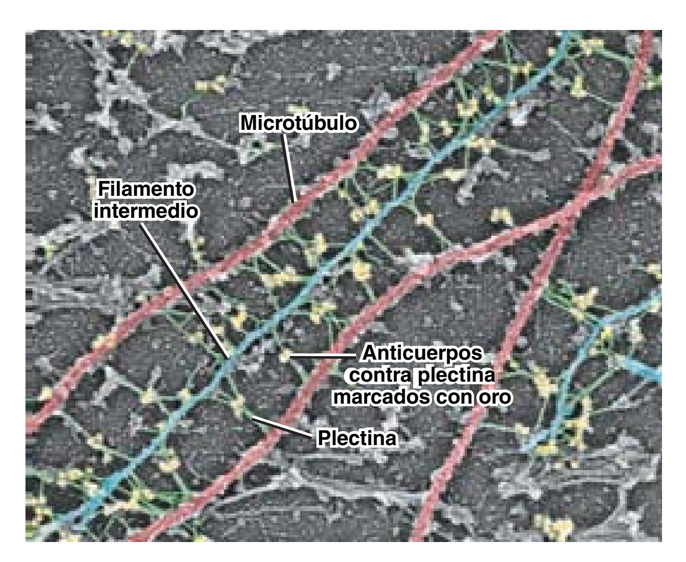


FIGURA 9-40 **Los elementos del citoesqueleto se conectan entre sí por medio de puentes de proteína.** Micrografía electrónica de la réplica de una pequeña porción del citoesqueleto de un fibroblasto después de la eliminación selectiva de filamentos de actina. Los componentes individuales se colorearon con técnica digital para ayudar a la visualización. Se observa que los filamentos intermedios (azul) están conectados con los microtúbulos (rojos) mediante puentes largos y delgados formados por la proteína fibrosa plectina (verde). La plectina se localiza mediante anticuerpos unidos con partículas de oro coloidal (amarillo). (Cortesía de Tatyana Svitkina y Gary Borisy.)

Cuadro 9-2 Propiedades y distribución de las principales proteínas de filamentos intermedios de los mamíferos

Proteína IF	Tipo de secuencia	Masa molecular promedio ($\times 10^{-3}$)	Número estimado de polipéptidos	Distribución hística principal
Queratina (ácida)	I	40–64	>25	Epitelios
Queratina (básica)	II	53–67	>25	Epitelios
Vimentina	III	54	1	Células mesenquimatosas
Desmina	III	53	1	Músculo
Proteína fibrilar ácida glial (GFAP)	III	50	1	Células gliales, astrocitos
Periferina	III	57	1	Neuronas periféricas
Proteínas de neurofilamento				Neuronas de nervios centrales y periféricos
NF-L	IV	62	1	
NF-M	IV	102	1	
NF-H	IV	110	1	
Nestina	IV	240	1	Hetereogéneas
Proteínas de lámina				Todos los tipos celulares
Lámina A	V	70	1	(Envolturas nucleares)
Lámina B	V	67	1	
Lámina C	V	60	1	

Fuente: adaptado de Kathryn Albers y Elaine Fuchs, *Int. Rev. Cytol.* 1992;134:244.

45 nm de largo (paso 2). Como los dos polipéptidos se alinean paralelos entre sí en la misma orientación, el dímero tiene polaridad, con un extremo definido por la terminación C de los polipéptidos y el extremo contrario por sus terminaciones N.

Ensamble y desensamble de filamentos intermedios

Se cree que la unidad básica del ensamble de los IF es un tetrámero formado por dos dímeros que se alinean lado a lado en forma intercalada con sus extremos N y C apuntando en direcciones contrarias (antiparalela), como se muestra en el paso 3 de la figura 9-41. Como los dímeros apuntan en sentido contrario, el tetrámero completo carece de polaridad. Los tetrámeros se relacionan entre sí de dos maneras, lado a lado y extremo con extremo para formar intermediarios poco conocidos que forman el filamento final (paso 4). Puesto que los bloques tetraméricos de construcción carecen de polaridad, el filamento ensamblado tampoco la tiene, otra característica que distingue a los IF de otros elementos del citoesqueleto. Lo mismo que las fibras de colágena de la matriz extracelular, que también se componen de unidades intercaladas, los IF son muy resistentes a las fuerzas de tensión (tracción).

Los filamentos intermedios tienden a ser menos sensibles a los agentes químicos que otros tipos de elementos citoesqueléticos y más difíciles de disolver. A causa de su insolubilidad, al principio se pensó que los IF eran estructuras permanentes e inmutables, por lo que sorprendió encontrar que tienen un comportamiento dinámico in vivo. Cuando subunidades marcadas de queratina se inyectaron en cultivos de células cutáneas, se incorporaron con rapidez en los IF existentes. Algo que resultó sorprendente es que las subunidades no se incorporan en los extremos del filamento, como podría esperarse por analogía con el ensamble de microtúbulos y microfilamentos, sino que se inclu-

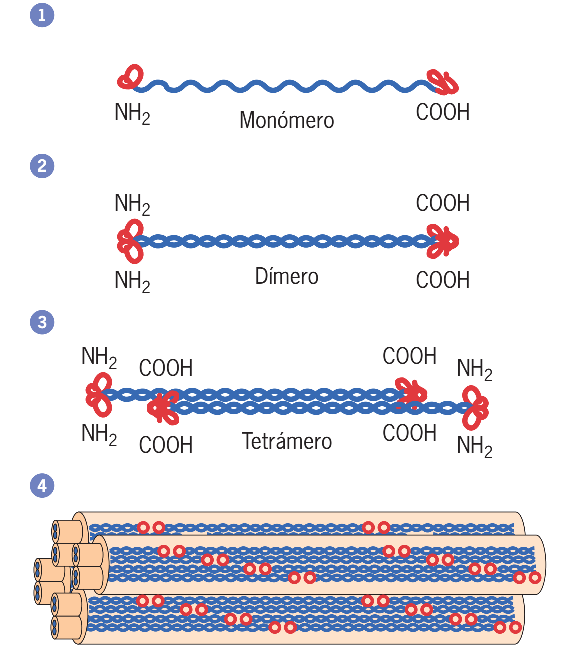
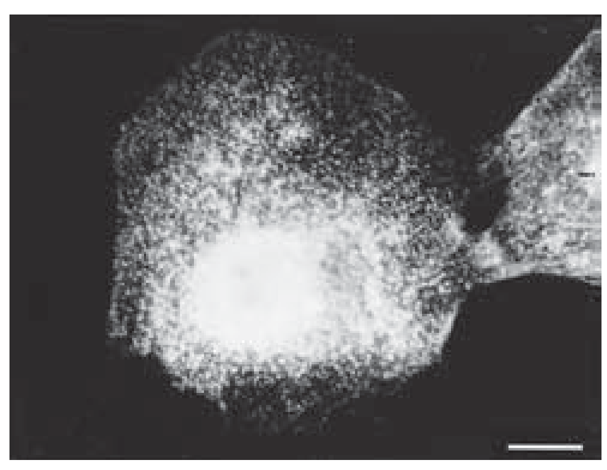
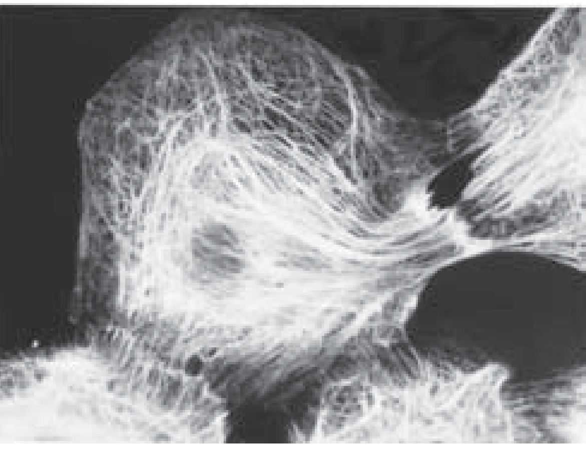


FIGURA 9-41 Modelo del ensamble y la arquitectura del filamento intermedio. Cada monómero tiene un par de dominios globulares terminales separados por una larga región helicoidal alfa (paso 1). Los pares de monómeros se organizan en orientación paralela, con sus extremos alineados para formar dímeros (paso 2). Según el tipo de filamento intermedio, los dímeros pueden formarse con monómeros idénticos (homodímeros) o no idénticos (heterodímeros). A su vez los dímeros se organizan en forma intercalada antiparalela para formar tetrámeros (paso 3), que se consideran la subunidad básica en el ensamble de los filamentos intermedios. La organización de las subunidades tetraméricas dentro del filamento se muestra en el paso 4. No se requiere ATP ni GTP para ninguno de estos pasos de ensamblaje.



(a)



(b)

FIGURA 9-42 **Demostración experimental del carácter dinámico de los filamentos intermedios.** Estas fotografías muestran los resultados de un experimento en el que se aplicó, mediante microinyección, queratina tipo I con biotina marcada a células epiteliales cultivadas, y se localizó 20 min después con técnica de inmunofluorescencia. La fotografía *a* muestra la localización de la queratina marcada con biotina inyectada (como lo revelan los anticuerpos contra biotina) que se incorporó en los filamentos durante el periodo de 20 min posterior a la inyección. La fotografía *b* muestra la distribución de los filamentos intermedios en la célula, revelada por los anticuerpos contra queratina. El patrón punteado de la fluorescencia en *a* indica que las subunidades inyectadas se incorporaron en los filamentos existentes en sitios a todo lo largo, no en sus extremos. (Compárese con el experimento similar con tubulina marcada que se muestra en la figura 9-26.) La barra representa 10 μm. (Tomada de Rita K. Miller, Karen Vikstrom y Robert D. Goldman, J Cell Biol 113:848, 1991; mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

yen en el interior del filamento (fig. 9-42). Al principio los filamentos se marcan en sitios dispersos en toda su extensión, pero en alrededor de 1 h toda la red de filamentos intermedios está marcada. Estos resultados sugieren que las células epidérmicas contienen una reserva de subunidades de queratina que, como las subunidades de microtúbulos y microfilamentos, están en equilibrio dinámico con la forma polimerizada. Hallazgos similares se obtuvieron con los IF de las neuronas. La fosforilación y la desfosforilación de las subunidades controlan el ensamble y el desensamble de casi todos los tipos de IF. Por ejemplo, la fosforilación de los filamentos de vimentina por la cinasa de proteína A ocasiona que los filamentos se desensamblen.

Tipos y funciones de los filamentos intermedios

Los filamentos de queratina constituyen las principales proteínas estructurales de las células epiteliales (entre ellas células epidérmicas, hepatocitos y células acinares pancreáticas). Los haces de IF de queratina forman una red elaborada similar a una jaula alrededor del núcleo y que se dispersa por el citoplasma (figura 9-43 y parte inferior de la figura 9-45). Muchos de estos filamentos terminan en las placas citoplásmicas de los desmosomas y los hemidesmosomas que unen estas células con otras y con la membrana basal subyacente (págs. 262 y 254).

El citoplasma de las neuronas contiene haces flojos de filamentos intermedios cuyo eje longitudinal se orienta en paralelo con el del axón de la célula nerviosa (véase fig. 9-13*b*). Estos IF, o **neurofilamentos**, como se les conoce, están formados por tres proteínas distintas: NF-L, NF-H y NF-M, todas del tipo del grupo IV del cuadro 9-2. A diferencia de los polipéptidos de otros filamentos intermedios, NF-H y NF-M tienen brazos laterales que se proyectan fuera del neurofilamento. Se piensa que estos brazos laterales mantienen el espacio apropiado entre los neurofilamentos paralelos del axón (véase fig. 9-13*b*). En las etapas iniciales de diferenciación, cuando el axón crece hacia una célula blanco, contiene muy pocos neurofilamentos pero grandes cantidades de microtúbulos de soporte. Una vez que la célula nerviosa se extendió por completo, se llena con neurofilamentos que le brindan soporte mientras el diámetro del axón crece en forma notable. La agregación de NF se observa en varios trastornos neurodegenerativos del ser humano, como ALS y enfermedad de Parkinson. Estos agregados de NF pueden bloquear el transporte axónico, lo que ocasiona la muerte de las neuronas afectadas.

Los esfuerzos recientes para explorar la función de los IF se basan en ratones modificados por ingeniería genética que producen un polipéptido particular de IF (una eliminación génica, página 332) o un polipéptido IF alterado. Tales estudios revelaron la importancia de los filamentos intermedios en tipos

FIGURA 9-43 **Distribución de filamentos intermedios con queratina en células de piel cultivadas (queratinocitos).** Puede verse que los filamentos forman una red similar a una jaula alrededor del núcleo y también se extienden a la periferia de la célula. (Tomada de Pierre A. Coulombe y M. Bishr Omary, Curr Opin Cell Biol 14:111, 2002.)

particulares de células. Por ejemplo, los ratones con deleciones en el gen que codifican para K14, un tipo de polipéptido de queratina que suele sintetizarse en células de la capa basal de la epidermis, tienen problemas graves de salud. Estos ratones son tan sensibles a la presión mecánica que aun un traumatismo leve, como el que ocurre durante el paso por el canal del parto o durante el amamantamiento del recién nacido, puede causar la formación de vesículas graves en la piel o la lengua. Este fenotipo se parece mucho a una rara enfermedad ampollar de la piel en los humanos, la *epidermólisis ampollar simple* (*EBS*, del inglés *epidermolysis bullosa simplex*).[3] El análisis posterior de pacientes con esta enfermedad mostró que tienen mutaciones en el gen que codifica el polipéptido homólogo K14 (o el polipéptido K5, que forma dímeros con K14). Estos estudios confirman la participación de los IF en la impartición de fuerza mecánica a las células de las capas epiteliales. Del mismo modo los ratones con eliminaciones génicas que no producen el polipéptido desmina muestran alteraciones graves en el músculo esquelético y cardiaco. La desmina desempeña una función estructural clave para mantener la alineación de las miofibrillas de una célula muscular y la ausencia de estos IF torna muy frágiles las células. Una enfermedad humana hereditaria, la *miopatía relacionada con desmina*, se debe a mutaciones en el gen que codifica esta proteína. Las personas con este trastorno sufren debilidad muscular esquelética, arritmias cardiacas y por último insuficiencia cardiaca congestiva. No todos los polipéptidos de los IF cumplen funciones tan esenciales. Por ejemplo, los ratones que carecen del gen para la vimentina, que se expresa en los fibroblastos, los macrófagos y los leucocitos, no presentan alteraciones evidentes, aunque las células afectadas carecen de IF citoplásmicos. Con base en estos estudios resulta evidente que los IF tienen funciones específicas según el tejido, que son más importantes en algunas células que en otras.

REVISIÓN

1. Mencione algunos ejemplos que refuercen la idea de que los filamentos intermedios son importantes en particular en algunas funciones hísticas específicas, más que en actividades básicas que todas las células realizan.
2. Mencione las similitudes y las diferencias entre el ensamble de microtúbulos y el de filamentos intermedios.

9.5 MICROFILAMENTOS

Las células poseen una notable capacidad para moverse. Las células de la cresta neural de un embrión vertebrado salen del sistema nervioso en desarrollo y migran por todo lo ancho del embrión para formar productos tan diversos como las células pigmentarias de la piel, los dientes y el cartílago de las mandíbulas (véase fig. 7-11). Legiones de leucocitos patrullan los tejidos del cuerpo en busca de detritos y microorganismos. Ciertas partes de las células también pueden moverse; las amplias proyecciones de las células epiteliales en el borde de una herida actúan como dispositivos móviles que tiran de la hoja de células para cubrir el área dañada y sellar la herida. De igual manera el borde líder de un axón en crecimiento emite procesos microscópicos que exploran el sustrato y guían la célula hacia su blanco sináptico. La totalidad de estos ejemplos de motilidad comparte por lo menos un componente: todos dependen de la presencia de microfilamentos, el tercer tipo de elemento principal del citoesqueleto. Los microfilamentos también participan en los procesos de motilidad celular, como el movimiento de vesículas, la fagocitosis y la citocinesis. De hecho se cree que las células vegetales dependen sobre todo de los microfilamentos, no de los microtúbulos, para transportar a larga distancia vesículas citoplásmicas y organelos. Esta tendencia hacia la motilidad basada en microfilamentos refleja la distribución muy limitada de los microtúbulos en muchas células vegetales (véase fig. 9-12).

Los **microfilamentos** miden alrededor de 8 nm de diámetro y se componen de subunidades globulares de la proteína **actina**. En presencia de ATP, los monómeros de actina se polimerizan para formar un filamento helicoidal flexible. Como resultado de esta organización en subunidades (fig. 9-44*a*), un filamento de actina es en esencia una estructura con dos hendiduras helicoidales que recorren toda su longitud (fig. 9-44*b*). Los términos "filamento de actina", "actina-F" y "microfilamento" son sinónimos para este tipo de filamento. Como cada subunidad de actina tiene polaridad y todas las subunidades de un filamento de actina se orientan en la misma dirección, todo el microfilamento tiene polaridad. Según el tipo de célula y la actividad en la que participa, los filamentos de actina pueden organizarse en conjuntos muy ordenados, en redes laxas y poco definidas o en haces anclados con firmeza.

Es posible identificar con seguridad los filamentos de actina en una célula determinada con una prueba citoquímica que aproveche el hecho de que los filamentos de actina interactúan en forma muy específica con la proteína miosina, sin importar el sitio de origen de la actina. Para facilitar la interacción, la miosina purificada (obtenida de tejido muscular) se divide en fragmentos mediante la acción de una enzima proteolítica. Uno de estos fragmentos, llamado S1 (véase fig. 9-49), se une con las moléculas de actina a todo lo largo del microfilamento. Además de identificar los filamentos como actina, los fragmentos unidos de S1 revelan la polaridad del filamento. Cuando los fragmentos S1 se unen, un extremo del microfilamento se ve *afilado* como la punta de una flecha, mientras que el otro se observa *barbado.* La figura 9-45 presenta un ejemplo de esta "decoración" en punta de flecha en las microvellosidades de las células epiteliales intestinales. La orientación de las puntas de flecha formadas por el complejo S1-actina brinda información respecto a la dirección en la que es probable que los microfilamentos se muevan por medio de una proteína motora miosina. La actina también puede localizarse con el microscopio óptico si se utiliza faloidina con marca fluorescente (fig. 9-74*a*), que se une con los filamentos de actina o con anticuerpos fluorescentes contra actina.

La actina se identificó hace más de 50 años como una de las principales proteínas contráctiles de las células musculares. Desde entonces, la actina se reconoció como la principal proteína en todos los tipos de células eucariotas examinadas. Las especies vegetales superiores y animales tienen varios genes codificadores de actina cuyos productos codificados se especializan en distintos tipos de procesos motrices. Las actinas se han

[3] Como se mencionó en el capítulo 7, algunos tipos similares de enfermedades ampollares pueden deberse a defectos en las proteínas del hemidesmosoma, que une la capa basal de la epidermis con la membrana basal.

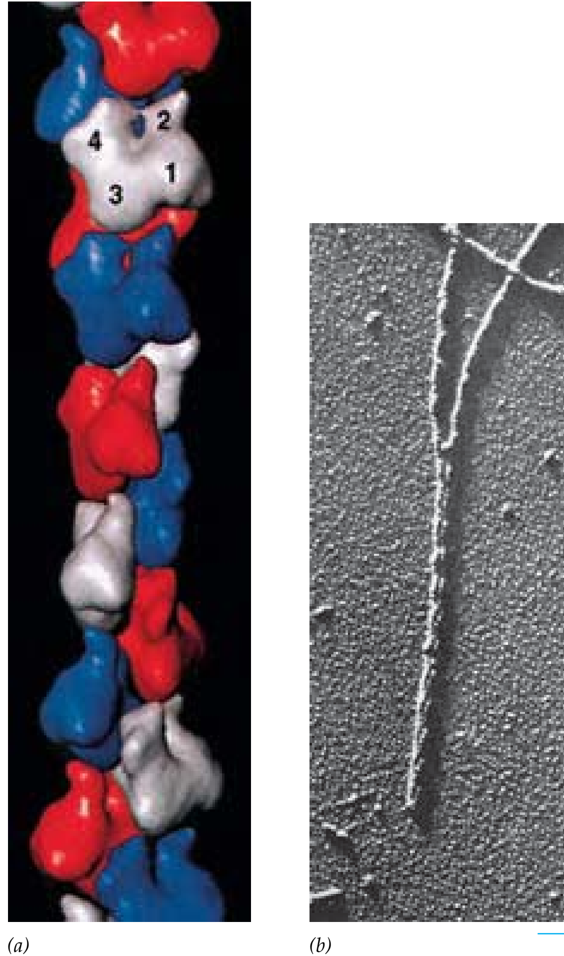


FIGURA 9-44 Estructura de un filamento de actina. *a*) Modelo de un filamento de actina. Las subunidades de actina se representan en tres colores para distinguir con más facilidad las subunidades consecutivas. Los subdominios en una de las subunidades de actina se marcaron como 1, 2, 3 y 4, y la hendidura para unión de ATP es evidente en cada unidad. Los filamentos de actina tienen polaridad, que se evidencia por un extremo más y uno menos. La hendidura de unión con actina (en la subunidad roja superior) se encuentra en el extremo menos del filamento. *b*) Micrografía electrónica de una réplica de un filamento de actina que muestra su arquitectura helicoidal doble. (*A*, TOMADA DE MICHAEL F. SCHMID ET AL. CORTESÍA DE WAH CHIU, J CELL BIOL 124:346, 1994; MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS; *B*, TOMADA DE ROBERT H. DUPUE, JR. Y ROBERT V. RICE, J MOL BIOL 12:302, 1965. DERECHOS RESERVADOS 1965, CON AUTORIZACIÓN DEL EDITOR, ACADEMIC PRESS Y ELSEVIER SCIENCE.)

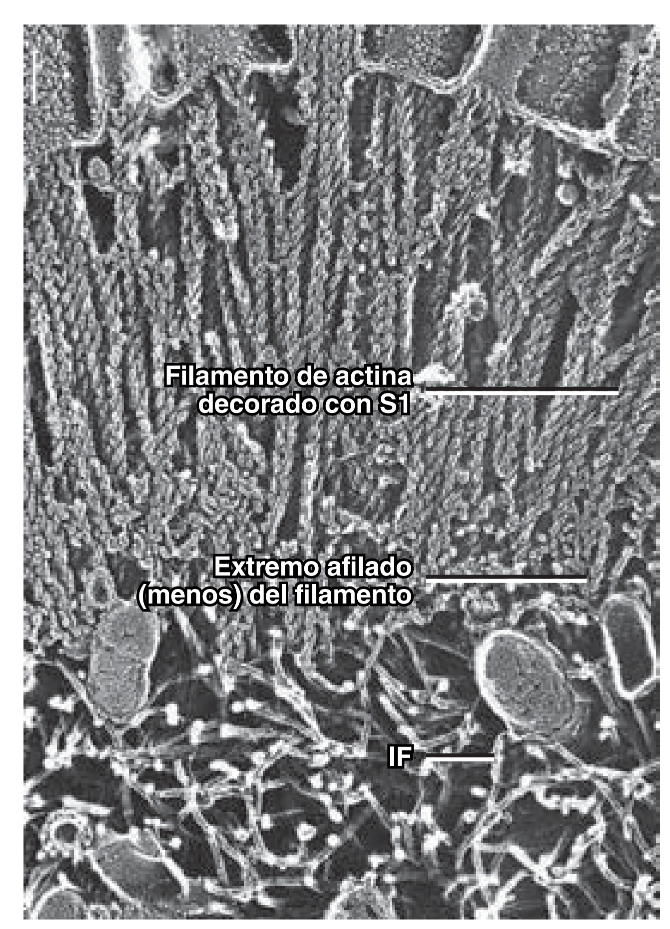


FIGURA 9-45 Determinación de la localización y la polaridad de los filamentos de actina mediante el uso de la subunidad S1 de miosina. Micrografía electrónica de una réplica que muestra los haces de microfilamentos en el centro de las microvellosidades de una célula epitelial intestinal. La célula se fijó, se trató con fragmentos S1 de miosina, se congeló, fracturó y grabó para exponer los componentes de los filamentos del citoplasma. Los filamentos intermedios (IF) de la parte inferior de la micrografía no contienen actina, por lo que no se unen con los fragmentos S1 de miosina. Estos filamentos intermedios se originan en los desmosomas de las superficies laterales de la célula. (TOMADA DE N. HIROKAWA, L. G. TILNEY, K. FUJIWARA Y J. E. HEUSER, J CELL BIOL 94:430, 1982; MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

conservado en forma notable a lo largo de la evolución de los eucariotas. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las moléculas de actina de una levadura y de una célula muscular esquelética de conejo son idénticas en 88%. De hecho las moléculas de actina de distintas fuentes pueden polimerizarse juntas para formar filamentos híbridos.

Ensamble y desensamble de microfilamentos

Antes de incorporarse en un microfilamento, un monómero de actina se une con una molécula de ATP. La actina es una ATP-asa, tal como la tubulina es una GTP-asa, y la función del ATP en el ensamble de la actina es similar al del GTP en el armado de un microtúbulo (pág. 346). El ATP unido con un monómero de actina se hidroliza en ADP en algún momento después de su incorporación en el filamento de actina en crecimiento. Por tanto la mayor parte del filamento de actina consiste en subunidades ADP-actina.

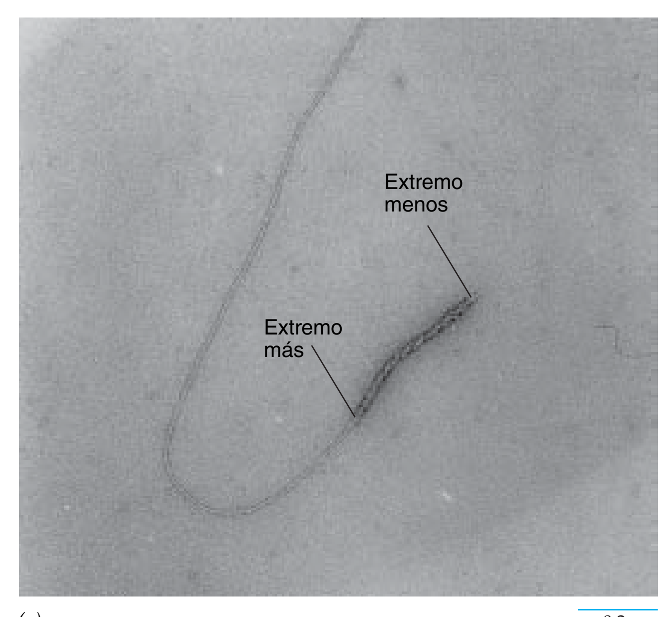
La polimerización de la actina es fácil de demostrar in vitro en soluciones que contienen monómeros de ATP-actina. Como en el caso de los microtúbulos, la etapa inicial en la formación de filamentos (o sea, la *nucleación*) es lenta, en tanto que la etapa posterior de *elongación* del mismo es mucho más rápida. La etapa de nucleación de la formación de un filamento puede evitarse si se incluyen filamentos de actina ya formados en la

mezcla de reacción. Cuando los filamentos de actina ya formados se incuban con una concentración elevada de monómeros ATP-actina, ambos extremos del microfilamento adquieren la marca, pero uno tiene mayor afinidad por los monómeros y los incorpora con una velocidad cinco a 10 veces mayor que el otro extremo. La decoración con el fragmento S1 de miosina revela que el extremo barbado (o más) del microfilamento es el que crece con mayor rapidez, mientras que el extremo afilado (o menos) es la punta de crecimiento lento (fig. 9-46*a*).

La figura 9-46*b* ilustra cómo los fenómenos que ocurren durante el ensamble y el desensamble de actina in vitro dependen de la concentración de monómeros de actina. Supóngase que se comienza con la adición de filamentos preformados de actina (semillas) a una solución de actina en presencia de ATP (paso 1). En tanto la concentración de monómeros ATP-actina permanezca alta, continuará la adición de subunidades en ambos extremos del filamento (fig. 9-46*b*, paso 2). Conforme los monómeros en la mezcla de reacción se consumen mediante la adición a los extremos de los filamentos, la concentración de los monómeros ATP-actina libres continúa en descenso hasta llegar a un punto en que la adición de monómeros continúa en el extremo más, que tiene mayor afinidad por ATP-actina, pero cesa en el extremo menos, cuya afinidad por ATP-actina es menor (paso 3). La concentración de monómeros libres cae aún más conforme la elongación del filamento continúa. En este momento aún se agregan monómeros en el extremo más de los filamentos, pero hay una pérdida neta de subunidades en el extremo menos. Cuando la concentración de monómeros disminuye más, se alcanza un punto en el que las dos reacciones en los extremos opuestos de los filamentos se equilibran, de manera que la concentración de monómeros libres permanece constante (paso 4). Este tipo de equilibrio entre dos actividades contrarias es un ejemplo de *estado estable* (pág. 93) y ocurre cuando la concentración de ATP-actina es cercana a 0.1 μM. Como en el estado estable las subunidades que se agregan a los extremos más se retiran de los extremos menos de cada filamento, las subunidades individuales en realidad se mueven a lo largo de cada filamento, un proceso que se conoce como "efecto de noria" (pasos 4 y 5). Los estudios en células vivas que contienen subunidades de actina con marca fluorescente apoyan la ocurrencia del efecto de noria in vivo (véase fig. 9-54*c*).

Las células mantienen un equilibrio dinámico entre las formas monoméricas y poliméricas de la actina, tal como lo hacen con los microtúbulos. Como se explica en la página 375, la velocidad de ensamble y desensamble de los filamentos de actina en la célula depende de varias proteínas "accesorias" diferentes. Los cambios en las condiciones locales en una región particular de la célula pueden desviar el equilibrio hacia el ensamble o el desensamble de los microfilamentos. Con el control de este equilibrio, la célula puede reorganizar su citoesqueleto de microfilamentos. Tal reorganización es necesaria para los procesos dinámicos como la locomoción celular, los cambios en la forma celular y la citocinesis. Estas actividades se revisan en las páginas siguientes.

Como se mencionó, los filamentos de actina participan en casi todos los procesos motrices de la célula. La participación de estos filamentos es fácil de demostrar si las células se tratan con alguno de los fármacos siguientes que interrumpen las actividades basadas en la dinámica de los microfilamentos: citocalasina, obtenida de un moho y que se une con los extremos más de los filamentos de actina, lo que permite la despolimerización en



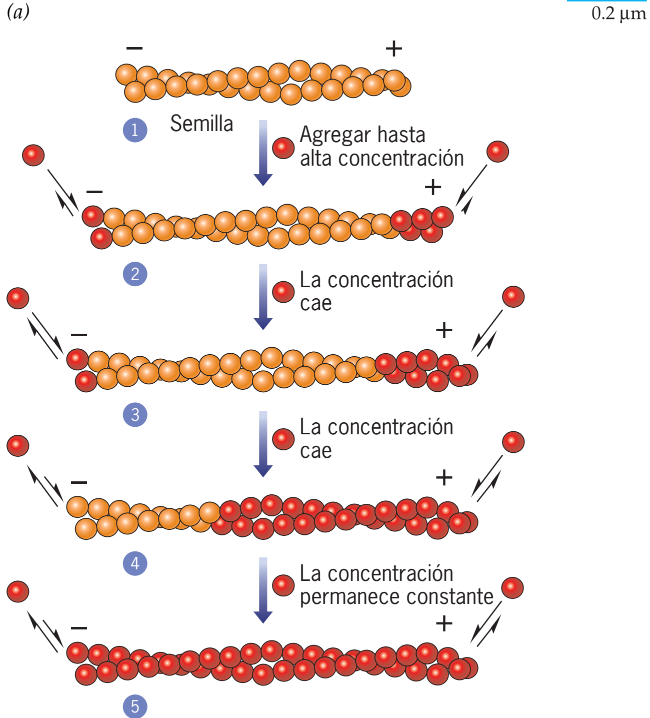
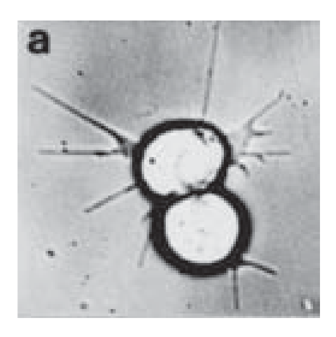
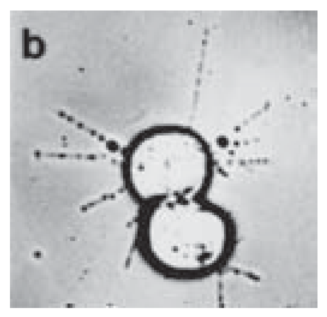


FIGURA 9-46 Ensamble de actina in vitro. *a*) Micrografía electrónica de un filamento corto de actina que se marcó con miosina S1 y luego se usó para formar el núcleo en la polimerización de la actina. La adición de subunidades de actina ocurre con mucha mayor rapidez en el extremo barbado (más) que en el extremo afilado (menos) del filamento preexistente. *b*) Esquema de la cinética del ensamble de un filamento de actina in vitro. Todas las subunidades naranja son parte de la semilla original, las subunidades rojas estaban presentes en solución al principio de la incubación. Los pasos se describen en el texto. Una vez que la concentración del estado estable de monómeros se alcanza, las subunidades se agregan al extremo más con la misma velocidad que se liberan del extremo menos. Como resultado las subunidades se mueven como una rueda de noria por el filamento in vitro. Nota: no se intentó distinguir las subunidades con un ATP de las que se unen con ADP. (*A*, cortesía de M. S. Runge y T. D. Pollard.)





10 µm

FIGURA 9-47 Efecto de la citocalasina en las estructuras que contienen filamentos de actina. Un par de células mesenquimatosas con procesos filamentosos finos (filópodos) después de 30 seg *a* y de 5 min *b* de exposición a citocalasina D. El fármaco ocasiona la disolución de los procesos celulares, que se componen sobre todo de filamentos de actina. (Tomada de Gerald Karp y Michael Solursh, Dev Biol 112:281, 1985.)

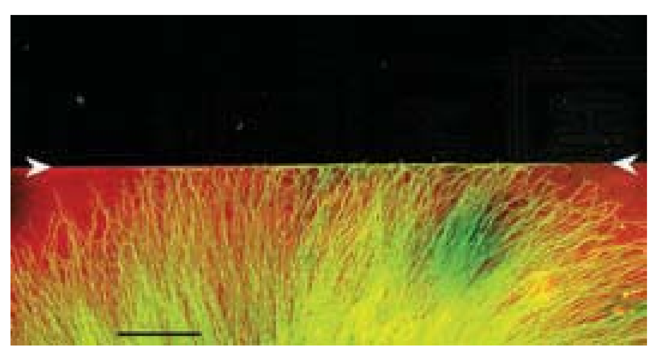
el extremo menos; faloidina, obtenida de un hongo venenoso y que se une con los filamentos intactos de actina para impedir su recambio, y la trunculina, obtenida de una esponja y que se une con los monómeros libres para bloquear su incorporación en el polímero. Los procesos mediados por microfilamentos se detienen pronto cuando alguno de estos compuestos ingresa a la célula. La figura 9-47 muestra el efecto de la citocalasina D en los procesos motrices muy finos (*filópodos*) de las células de erizo marino.

Miosina: el motor molecular de los filamentos de actina

Ya se examinaron la estructura y las acciones de los motores moleculares cinesina y dineína, que operan en sentidos opuestos sobre rieles de microtúbulos. Hasta ahora todos los motores conocidos que funcionan con los filamentos de actina son miembros de la superfamilia de la miosina. Las miosinas (con la notable excepción de la miosina VI, que se analiza más adelante) se mueven hacia el extremo más de un filamento de actina.

La miosina se aisló por primera vez del tejido muscular esquelético de los mamíferos y luego de una gran variedad de células eucariotas, inclusive protistas, plantas, células extramusculares de animales y tejidos musculares cardiaco y liso de los vertebrados. Todas las miosinas comparten un dominio motor característico (cabeza). La cabeza contiene un sitio que se une con un filamento de actina y uno que se une con el ATP y lo hidroliza para impulsar el motor de miosina. Aunque los dominios de cabeza de varias miosinas son similares, los dominios de la cola son muy diversos. Las miosinas también contienen varias cadenas de bajo peso molecular (ligeras). Las miosinas suelen dividirse en dos grandes grupos, las **miosinas convencionales** (o **tipo II**) que se identificaron por primera vez en el tejido muscular, y las **miosinas no convencionales**. Las miosinas no convencionales se dividen con base en la secuencia de aminoácidos por lo menos en 17 tipos distintos (tipos I y III a XVIII). Algunas de estas clases se expresan de manera nativa en los eucariotas, mientras que otras son limitadas. Por ejemplo, la miosina X sólo se encuentra en vertebrados y las miosinas VIII y XI sólo están presentes en plantas. Los humanos tienen cerca de 40 miosinas distintas de por lo menos 11 clases, y se supone que cada una tiene una o más funciones especializadas. Las más conocidas de las diversas miosinas son las de tipo II.

Miosinas convencionales (tipo II) Las proteínas de clase miosina II son los principales motores para contracción muscular y también se encuentran en diversas células extramusculares. Entre sus actividades extramusculares, las miosinas tipo II son necesarias para dividir una célula en dos durante la división celular, para generar tensión en las adhesiones focales, y para cambiar el comportamiento de los conos de crecimiento (véase fig. 9-76). En la figura 9-48 se muestra el efecto de inhibir la actividad de la miosina II en un cono de crecimiento que avanza.



(a)

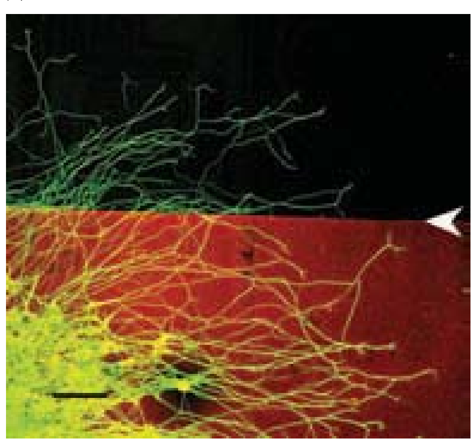

(b)

FIGURA 9-48 Demostración experimental de una función de la miosina II en el movimiento direccional de conos de crecimiento. *a*) Micrografía de fluorescencia que muestra prolongaciones finas (neuritas) que crecen a partir de un fragmento microscópico de tejido nervioso embrionario de ratón. Las neuritas (teñidas de verde) crecen desde un cubreobjetos de vidrio cubierto con tiras de laminina (teñidas de rojo). La laminina es un componente común de la matriz extracelular (pág. 247). La punta de cada prolongación nerviosa contiene un cono de crecimiento móvil. Cuando los conos de crecimiento llegan al borde de la tira de laminina (indicado por la línea con puntas de flecha), se vuelven abruptamente y siguen creciendo sobre la superficie cubierta de laminina. La barra representa 500 µm. *b*) El tejido para esta micrografía se obtuvo de un embrión de ratón que carecía de miosina IIB. Los conos de crecimiento ya no viran al llegar al borde de la superficie cubierta de laminina, lo cual hace que las neuritas crezcan incluso en la superficie desprovista de laminina (negro). (Reimpresa con autorización de Stephen G. Turney y Paul C. Bridgman, Nature Neurosci. 8:717, 2005; Copyright 2005, Macmillan Magazines Ltd.)

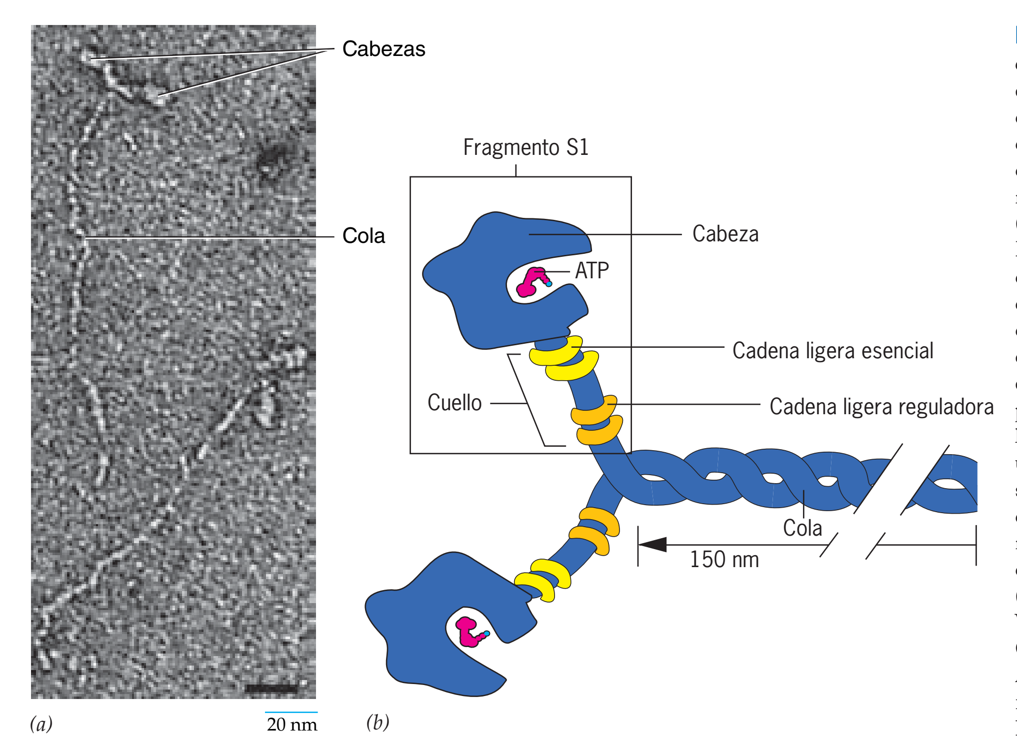


FIGURA 9-49 Estructura de una molécula de miosina II. *a*) Micrografía electrónica de moléculas de miosina con tinción negativa. Se observan con claridad las dos cabezas y la cola de cada molécula. *b*) Dibujo muy esquemático de una molécula de miosina II (masa molecular de 520 000 daltones). La molécula consiste en un par de cadenas pesadas (azul) y dos pares de cadenas ligeras, que se nombran como se indica. El par de cadenas pesadas se compone de una cola cilíndrica en la que porciones de las dos cadenas polipeptídicas se envuelven una sobre la otra para formar un rizo helicoidal y un par de cabezas globulares. Cuando se trata con una proteasa bajo condiciones ligeras, la molécula se divide al nivel de la unión entre el cuello y la cola, con lo que el fragmento S1 se genera. (*A*, TOMADA DE S. A. BURGESS, M. L. WALKER, H. D. WHITE Y J. TRINICK, J CELL BIOL 139:676, 1997; MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

La figura 9-49*a* muestra una micrografía electrónica de un par de moléculas de miosina II. Cada molécula está formada por seis cadenas polipeptídicas (un par de cadenas pesadas y dos pares de cadenas ligeras) que se organizan de tal forma que producen una proteína muy asimétrica (fig. 9-49*a*). El examen de la molécula de la figura 9-49*b* muestra que consiste en: 1) un par de cabezas globulares que contienen el sitio catalítico de la molécula; 2) un par de cuellos, cada uno formado por una sola hélice alfa continua y dos cadenas ligeras unidas, y 3) una sola cola cilíndrica formada por secciones helicoidales α largas de las dos cadenas pesadas.

Las cabezas de miosina aisladas (fragmentos S1 de la figura 9-49*b*) que se inmovilizaron en la superficie de un cubreobjetos de vidrio son capaces de deslizar los filamentos de actina unidos en una prueba in vitro como la que se muestra en la figura 9-50. Por tanto toda la maquinaria necesaria para la actividad motriz

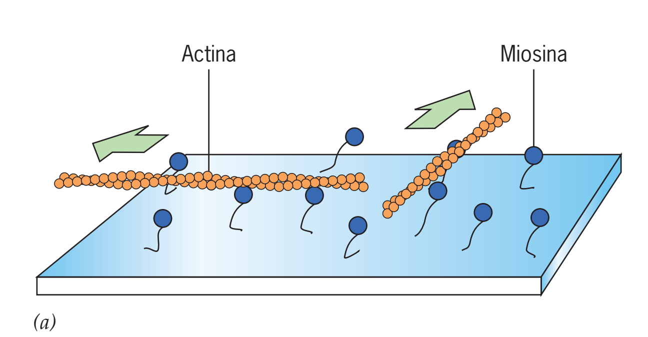
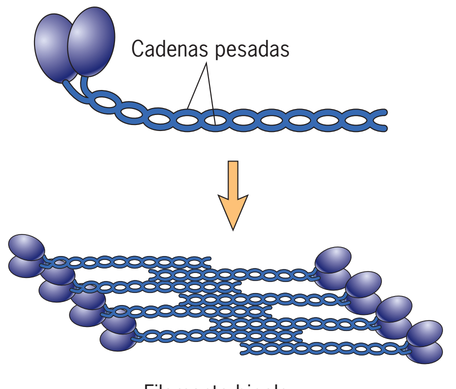


FIGURA 9-50 Prueba de motilidad in vitro para la miosina. *a*) Dibujo esquemático en el que las cabezas de miosina están unidas al cubreobjetos cubierto con silicón, que luego se incuba con una preparación de filamentos de actina. *b*) Resultados del experimento mostrado en *a*. Se tomaron dos imágenes de video con 1.5 seg de diferencia y se fotografiaron como una doble exposición en el mismo cuadro de película. Las líneas punteadas con puntas de flecha muestran el movimiento deslizante de los filamentos de actina sobre las cabezas de miosina durante el breve periodo entre las exposiciones. (TOMADA DE T. YANAGIDA, ADV BIOPHYSICS 26:82, 1990.)



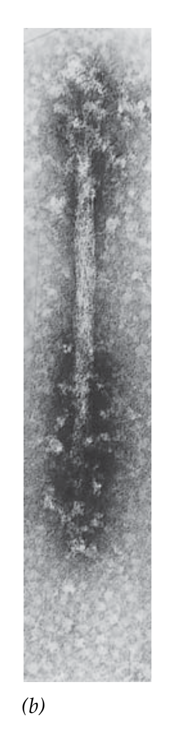
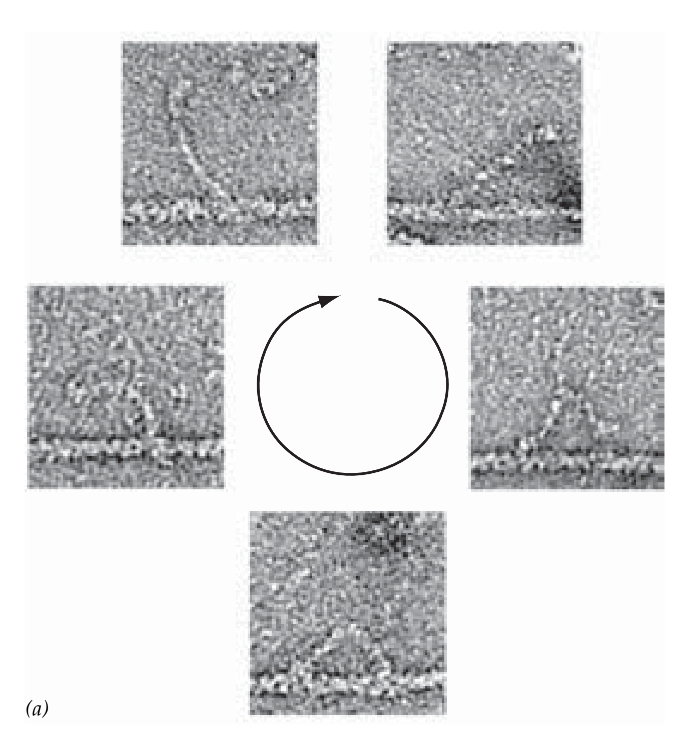


FIGURA 9-51 Estructura de un filamento bipolar de miosina II. *a*) Diagrama esquemático de la disposición intercalada de las moléculas individuales de miosina en un filamento de miosina II. *b*) Micrografía electrónica de un filamento bipolar de miosina formado in vitro. Las cabezas del filamento que se ven en ambos extremos dejan una sección lisa en el centro del filamento. (*B*, CORTESÍA DE HUGH HUXLEY.)

está contenida en una sola cabeza. El mecanismo de acción de la cabeza de miosina y la participación clave del cuello se explican en la página 371. La porción fibrosa de la cola de una molécula de miosina II tiene una función estructural, que permite que la proteína forme filamentos. Las moléculas de miosina II se ensamblan de tal modo que los extremos de las colas apuntan hacia el centro del filamento y las cabezas globulares señalan al lado contrario del centro (figs. 9-51 y 9-57). Como resultado el filamento se describe como *bipolar*, lo que indica una inversión de la polaridad en el centro del filamento. Puesto que son bipolares, las cabezas de miosina en los extremos opuestos de un filamento de miosina tienen la capacidad de tirar de los filamentos de actina para aproximarlos, como ocurre en una célula muscular. Como se describe en la siguiente sección, los filamentos de miosina II que se ensamblan en las células musculares esqueléticas son componentes muy estables del aparato contráctil. Sin embargo, los filamentos de miosina II más pequeños que se forman en la mayoría de las células extramusculares a menudo muestran una construcción transitoria, se ensamblan cuando y donde se necesitan para desarmarse después de actuar.

Miosinas no convencionales En 1973, Thomas Pollard y Edward Korn de los *National Institutes of Health* describieron una proteína única similar a la miosina que extrajeron del protista *Acanthamoeba*. A diferencia de la miosina muscular, esta miosina no convencional más pequeña era incapaz de ensamblar filamentos in vitro. La proteína recibió el nombre de miosina I, y su localización en las microvellosidades se muestra en la figura 9-66. A pesar de un estudio considerable, la función exacta de la miosina I en las actividades celulares aún se desconoce.

Los pasos dados por otro tipo de miosina no convencional, la miosina V, se revelaron en una serie de micrografías electrónicas que capturan la molécula en varias etapas de su ciclo mecánico (fig. 9-52*a*). La miosina V tiene dos cabezas que se



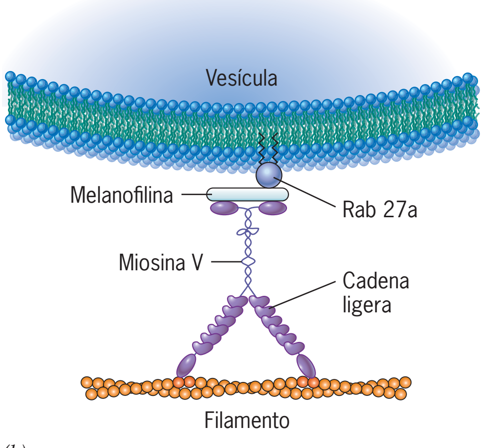


FIGURA 9-52 Miosina V, una miosina no convencional de dos cabezas que participa en el transporte de organelos. *a*) Esta serie de micrografías electrónicas con tinción negativa muestra moléculas individuales de miosina V que se atraparon en distintas etapas de su ciclo mecánico mientras cada una de ellas "camina" por el filamento de actina. La flecha circular muestra la secuencia de una molécula que podría moverse de izquierda a derecha junto con el filamento de actina hacia su extremo barbado (más). La micrografía de la parte central inferior muestra una etapa del ciclo en la que ambas cabezas están unidas al filamento de actina con un espacio aproximado de 36 nm, lo que equivale a la repetición helicoidal del filamento. *b*) Dibujo esquemático de una molécula de miosina en la etapa equivalente a la micrografía central inferior de la parte *a*. Rab27a y una melanofilina sirven como adaptadores que unen la cola globular del motor a la membrana de la vesícula. (*A*, TOMADA DE MATTHEW L. WALKER ET AL. CORTESÍA DE PETER J. KNIGHT. REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE NATURE 405:804, 2000. DERECHOS RESERVADOS 2000; MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)

mueven de manera progresiva a lo largo de los filamentos de actina. Se cree que esta característica progresiva se debe a la gran afinidad de las cabezas de miosina por el filamento de actina, lo que asegura que cada cabeza permanezca unida al filamento hasta que la segunda cabeza se una de nuevo (como se muestra en la fotografía inferior de la figura 9-52). La miosina V también es notable por su cuello, que con sus 23 nm de largo mide tres veces más que el de la miosina II. Gracias a su cuello largo, la miosina V puede dar pasos muy grandes. Esto es muy importante para una proteína motora que se mueve en forma progresiva sobre un filamento de actina formado por cadenas de subunidades *helicoidales*. La hélice de actina se repite cada 13 subunidades (36 nm), justo el tamaño del paso de una molécula de miosina V (fig. 9-52*b*). Estos y otros estudios posteriores respecto al movimiento de moléculas individuales de miosina V sugieren que este motor camina a lo largo del filamento de actina con un modelo de "mano sobre mano", similar al que se muestra en la figura 9-15*b* para la cinesina. Para realizar este tipo de movimiento cada cabeza de miosina debe balancearse una distancia de 72 nm, dos veces la distancia que hay entre dos sitios de unión sucesivos en el filamento de actina (fig. 9-52*b*). Como resultado de estos pasos gigantes, la miosina V puede caminar con esta repetición en línea recta aunque el "camino" subyacente gire 360° en espiral bajo sus "pies".

Varias miosinas no convencionales (entre ellas las miosinas I, V y VI) se relacionan con diversos tipos de vesículas citoplásmicas y organelos. Algunas vesículas contienen motores basados en microtúbulos (cinesinas o dineína citoplásmica, o ambas) *y* motores basados en microfilamentos (miosinas no convencionales); de hecho los dos tipos de motores pueden vincularse físicamente entre sí. El movimiento de las vesículas y otros portadores membranosos a largas distancias dentro de células animales ocurre sobre los microtúbulos, como se describió antes. Sin embargo, una vez que se aproximan al extremo del microtúbulo, se cree que estas vesículas membranosas a menudo se cambian a los rieles de microfilamentos para efectuar el movimiento local en la periferia celular rica en actina (fig. 9-53).

La cooperación entre microtúbulos y microfilamentos está mejor estudiada en las células pigmentarias (fig. 9-53). En los mamíferos, los gránulos de pigmento (melanosomas) se transportan hacia procesos periféricos finos de la célula pigmentaria mediante una de las isoformas de la miosina V llamada Va. Luego los melanosomas se transfieren a los folículos pilosos donde se incorporan en un pelo en desarrollo. Los ratones que carecen de actividad de miosina Va son incapaces de transferir melanosomas a los folículos pilosos, lo que determina que su pelaje tenga un color mucho más claro. Los seres humanos que no poseen un gen normal que codifica la miosina Va sufren un raro trastorno denominado síndrome de Griscelli; estas personas tienen albinismo parcial (falta de coloración en la piel) y sufren otros síntomas que se consideran relacionados con los defectos en el transporte de vesículas. En el año 2000 se descubrió que un subgrupo de pacientes con síndrome de Griscelli tenía un gen normal para miosina Va, pero carecían de un gen funcional que codificara una proteína periférica de membrana llamada Rab27a. La familia Rab de proteínas se estudió en la página 304 como moléculas que fijan las vesículas con las membranas blanco. Ahora parece que las proteínas Rab también participan en la unión de los motores de miosina (y cinesina) con las superficies de membrana (fig. 9-52*b*).

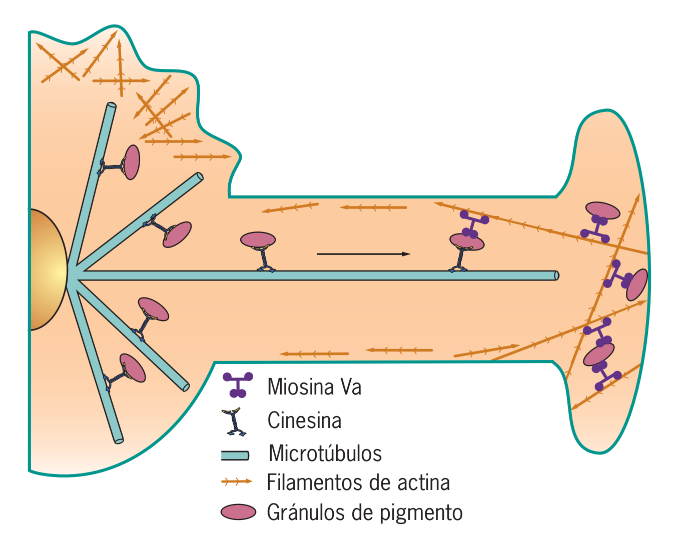


FIGURA 9-53 Las funciones contrastantes de los motores con base en el microtúbulo y el microfilamento en el transporte de organelos. Se cree que la mayor parte del transporte de organelos está mediada por miembros de las familias de la cinesina y la dineína, que trasladan su cargamento a distancias hasta cierto punto grandes. Al parecer algunas vesículas también llevan motores de miosina, como la miosina Va, que transporta su cargamento sobre microfilamentos, entre ellos los que se encuentran en las regiones periféricas (cortical) de la célula. Los dos tipos de motores pueden actuar en forma cooperativa como se ilustra aquí en el caso de una célula pigmentaria en la que los gránulos de pigmento se mueven atrás y adelante en procesos celulares prolongados. (Tomada de X. Wu et al., J Cell Biol 143:1915, 1998; mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

Las células pilosas, cuya estructura se muestra en la figura 9-54*a*, han constituido un sistema especialmente adecuado para estudiar las funciones de las miosinas no convencionales. Se llaman así por el paquete de estereocilios rígidos, similares a pelos que se proyectan desde la superficie apical de la célula hacia la cavidad del oído interno llena de líquido. El desplazamiento de los estereocilios por los estímulos mecánicos genera impulsos nerviosos que se perciben como sonidos. Los estereocilios carecen de relación con los cilios verdaderos expuestos antes. En vez de contener microtúbulos, cada estereocilio es sostenido por un paquete de filamentos de actina paralelos (fig. 9-54*b*) cuyos extremos barbados se localizan en la punta externa de la proyección y cuyos extremos aguzados se encuentran en la base. Los estereocilios han proporcionado algunas de las imágenes más impresionantes de la naturaleza dinámica del citoesqueleto de actina. Mientras que los estereocilios en sí son estructuras permanentes, los paquetes de actina se encuentran en flujo constante. Continuamente se unen monómeros de actina al extremo barbado de cada filamento, que recorren el cuerpo del filamento, y se disocian del extremo aguzado. Este proceso se captura en la micrografía de fluorescencia de la figura 9-54*c*, que muestra la incorporación de subunidades de actina marcadas con GFP en el extremo barbado de cada filamento. Varias miosinas no convencionales (I, V, VI, VII y XV) se localizan en diversos sitios del interior de las células pilosas del oído interno; dos de ellas se muestran en la figura 9-54*d* y *e*. Aún son inciertas las funciones precisas de estas diversas proteínas motoras. Las mutaciones en la miosina VIIa son la causa del síndrome de Usher tipo 1B, que

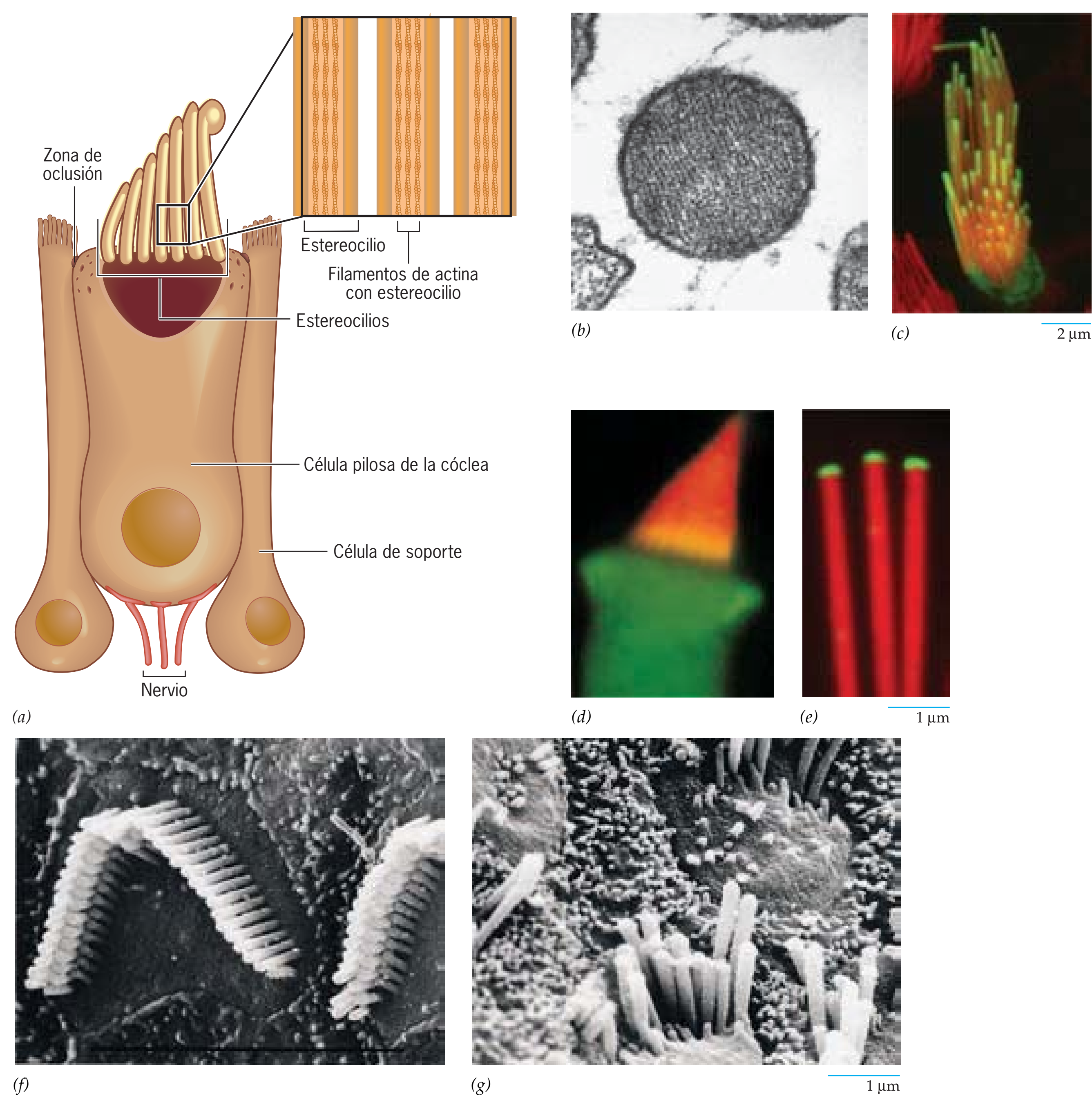


FIGURA 9-54 Células pilosas, paquetes de actina y miosinas no convencionales. *a*) Dibujo de una célula pilosa del caracol auditivo. El recuadro muestra una porción de varios estereocilios, formados por un paquete muy apretado de filamentos de actina. *b*) Micrografía electrónica de transmisión de un corte transversal de un estereocilio que muestra que éste se compone de un paquete denso de filamentos de actina. *c*) Micrografía de fluorescencia de una célula pilosa del oído interno de una rata. Las puntas de los estereocilios se tiñeron de verde debido a la incorporación de GFP-monómeros de actina en los extremos barbados. Los estereocilios más altos contienen una columna más larga de subunidades teñidas con GFP, lo cual refleja una incorporación más rápida de los monómeros de actina. Los estereocilios se ven rojos debido a la tinción mediante faloidina marcada con rodamina, que se une a los filamentos de actina. *d*) Una célula pilosa del oído interno de una rana toro. La localización de la miosina VIIa se indica en verde. Las bandas anaranjadas cercanas a las bases de los estereocilios (a causa de la superposición del rojo y el verde) indican una concentración de miosina VIIa. *e*) La miosina XVa (verde) se localiza en las puntas de los estereocilios de las células pilosas auditivas de una rata. *f*) Micrografía electrónica de barrido de las células pilosas del caracol de un ratón testigo. Los estereocilios están dispuestos en filas con forma de V. *g*) Micrografía correspondiente de las células pilosas de un ratón con mutaciones en el gen que codifica la miosina VIIa, las cuales causan sordera. Los estereocilios de las células pilosas se ven desorganizados. (*A*, TOMADA DE T. HASSON, CURR. BIOL. 9:R839, 1999; CON AUTORIZACIÓN DE ELSEVIER SCIENCE; *B*, CORTESÍA DE A. J. HUDSPETH, R. A. JACOBS Y P. G. GILLESPIE; *C, E*, TOMADAS DE A. K. RZADZINSKA, ET AL., CORTESÍA DE B. KACHAR, J. CELL BIOL. VOL. 164, 891, 892, 2004; *D*, TOMADA DE PETER GILLESPIE Y TAMA HASSON, J. CELL BIOL. VOL. 137, PORTADA #6, 1997; *C-E*, CON AUTORIZACIÓN DEL TITULAR DEL COPYRIGHT, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS; *F, G*, TOMADAS DE T. SELF, ET AL., CORTESÍA DE K. P. STEEL, DEVELOP. 125:560, 1998; CON AUTORIZACIÓN DE THE COMPANY OF BIOLOGISTS LTD.)

se caracteriza por sordera y ceguera. La figura 9-54*f*, *g* muestra los efectos morfológicos de las mutaciones en el gen de la miosina VIIa de las células pilosas del oído interno del ratón. Como sucede en los seres humanos, los ratones homocigóticos para el alelo mutante que codifica esta proteína motora son sordos. La miosina VI, un transportador de organelos en el citoplasma de muchas células, incluidas las pilosas, se distingue por su movimiento en "sentido inverso", es decir, hacia el extremo aguzado (menos) del filamento de actina. Se piensa que la miosina VI interviene en la formación de vesículas cubiertas de clatrina en la membrana plasmática y en el movimiento de vesículas sin cubierta hacia los endosomas tempranos (pág. 315).

Ahora que se describieron los puntos básicos de la estructura y la función de la actina y la miosina puede explicarse cómo interactúan estas dos proteínas para realizar una actividad celular compleja.

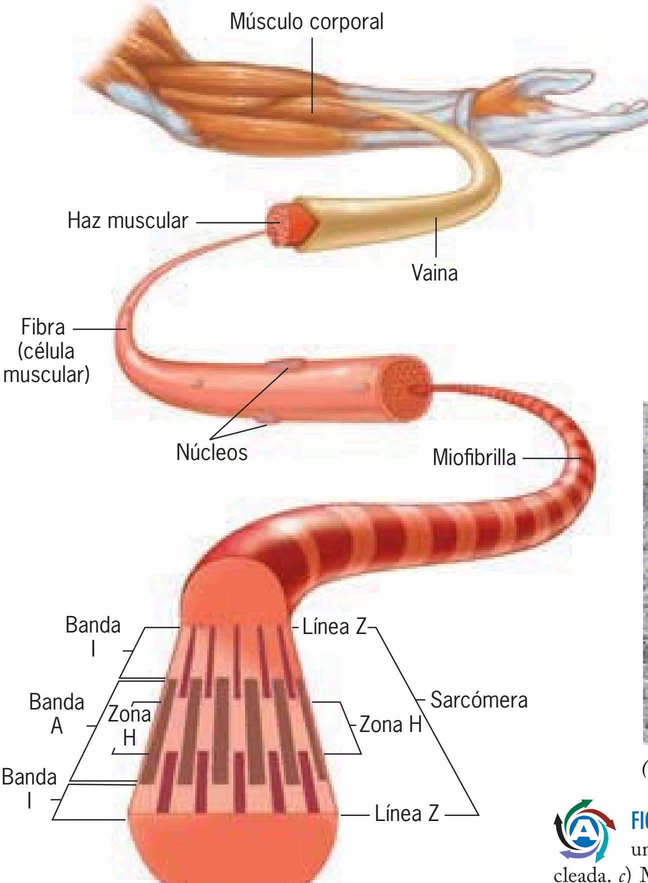
REVISIÓN ?

1. Mencione las similitudes y las diferencias en las características del ensamble de microtúbulos y el de filamentos de actina.
2. Compare la estructura de un microtúbulo, un filamento de actina y un filamento intermedio completamente ensamblados.
3. Describa tres funciones de los filamentos de actina.
4. Mencione las diferencias en la estructura y la función de la miosina II convencional y la miosina V no convencional.
5. ¿Cómo es posible que la misma vesícula se transporte a lo largo de microtúbulos y de microfilamentos?

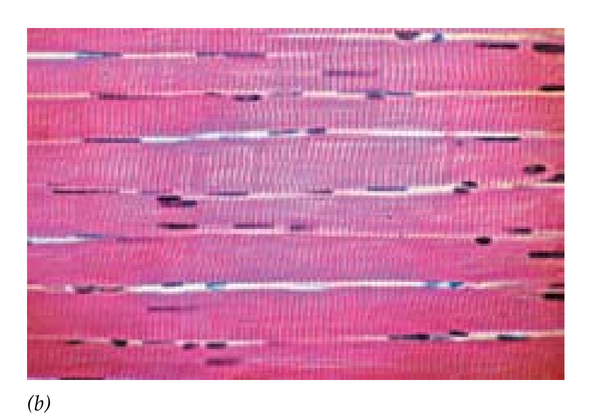
9.6 CONTRACTILIDAD MUSCULAR

Los músculos esqueléticos obtienen su nombre del hecho de que la mayor parte de ellos está anclada a los huesos que mueven. Se encuentran bajo el control voluntario y pueden contraerse mediante órdenes conscientes. Las células musculares esqueléticas tienen una estructura muy poco ortodoxa. Una sola célula muscular cilíndrica suele medir 10 a 100 μm de grueso, más de 100 mm de largo y contiene cientos de núcleos. A causa de estas propiedades, sería más apropiado llamar **fibra muscular** a estas células. Las fibras musculares tienen muchos núcleos porque cada una es producto de la fusión de grandes cantidades de *mioblastos* mononucleares (células premusculares) en el embrión.

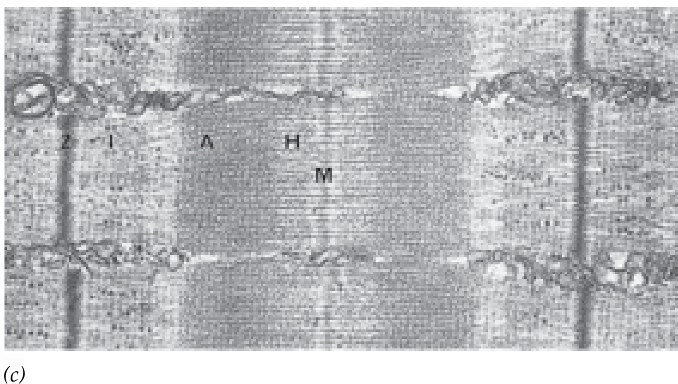
Es posible que las células de músculo esquelético tengan la estructura interna más ordenada de cualquier célula del cuerpo. Un corte longitudinal de una fibra muscular (fig. 9-55) revela un



(*a*)

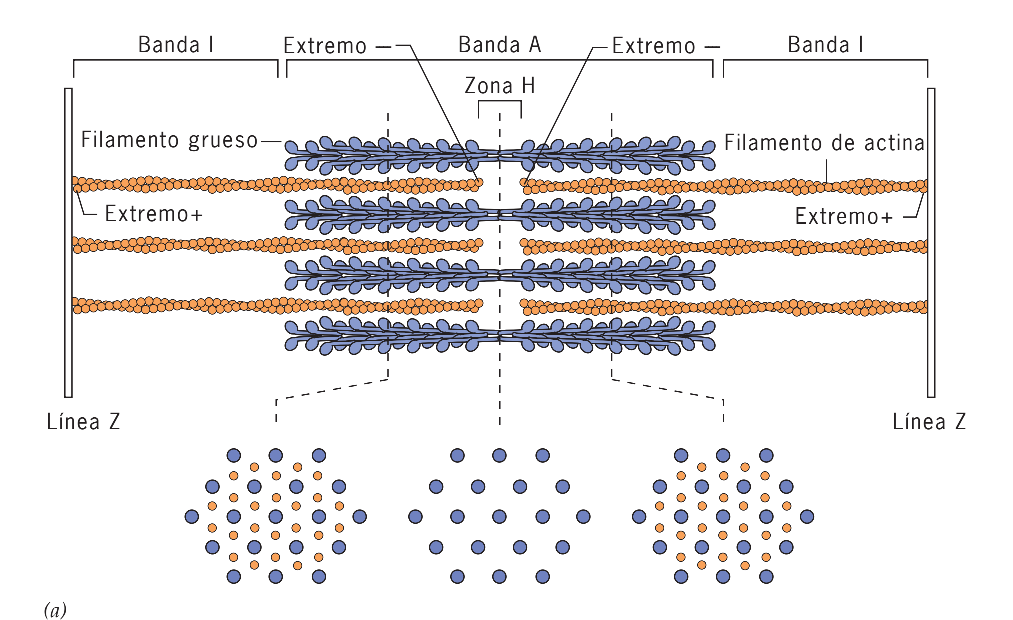


(*b*)



(*c*)

FIGURA 9-55 Estructura del músculo esquelético. *a*) Niveles de organización de un músculo esquelético. *b*) Micrografía óptica de una fibra muscular multinucleada. *c*) Micrografía electrónica de una sarcómera con las bandas señaladas con letras. (MICROGRAFÍA SUPERIOR: ERIC GRAVE/PHOTO RESEARCHERS, INC.; MICROGRAFÍA INFERIOR: CORTESÍA DE GERALDINE F. GAUTHIER.)



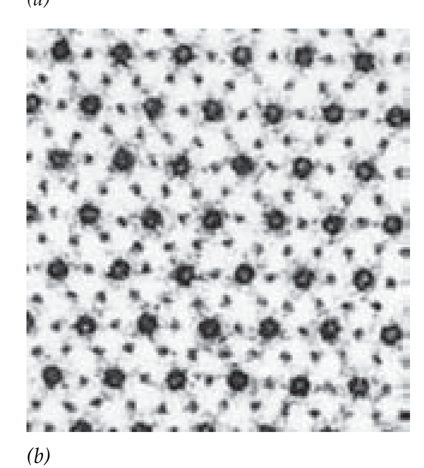


FIGURA 9-56 Maquinaria contráctil de una sarcómera. *a*) Diagrama de una sarcómera que muestra la organización superpuesta de los filamentos delgados que contienen actina (naranja) y los filamentos gruesos que contienen miosina (púrpura). Las pequeñas proyecciones transversales sobre la fibra de miosina representan las cabezas de miosina (puentes cruzados). *b*) Micrografía electrónica de un corte transversal a través de un músculo de insecto empleado para el vuelo que muestra la disposición hexagonal de los filamentos delgados alrededor de cada filamento grueso. (J. Auber/Photo Researchers.)

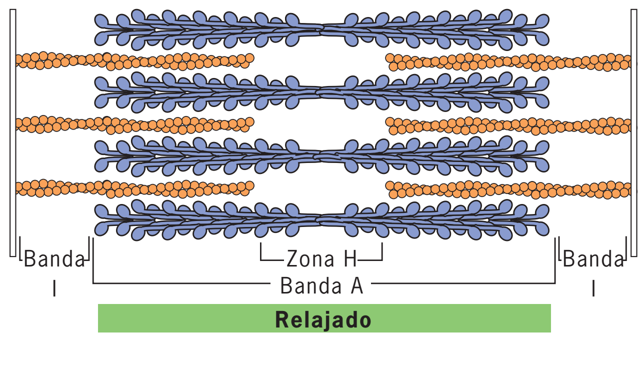
cable formado por cientos de hebras cilíndricas más delgadas, llamadas **miofibrillas**. Cada miofibrilla consiste en un conjunto lineal repetido de unidades contráctiles, llamadas **sarcómeras**. A su vez cada sarcómera tiene un patrón de bandas característico que confiere a la fibra muscular su apariencia *estriada*. El examen de fibras musculares teñidas y observadas bajo el microscopio electrónico muestra que el patrón de bandas es resultado de la superposición parcial de dos tipos distintos de filamentos: **filamentos delgados** y **filamentos gruesos** (fig. 9-56*a*). Cada sarcómera se extiende de una *línea Z* a la siguiente línea Z y contiene varias bandas oscuras y zonas claras. Una sarcómera tiene un par de *bandas I* claras localizadas en los bordes externos, una *banda A* más oscura ubicada entre las bandas I externas y una *zona H* de tinción clara que se encuentra en el centro de la banda A. Se observa una *línea M* oscura en el centro de la zona H. La banda I contiene sólo filamentos delgados y la zona H sólo filamentos gruesos; las partes de la banda A que están a ambos lados de la zona H representan la región de superposición y contienen ambos tipos de filamentos.

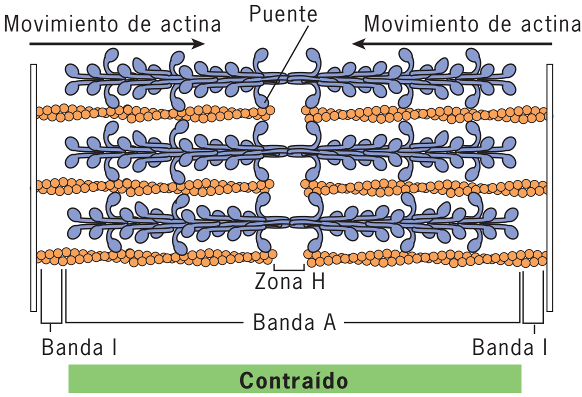
Los cortes transversales a través de la región de superposición muestran que los filamentos delgados se organizan en un conjunto hexagonal alrededor de cada filamento grueso y que cada filamento delgado se sitúa entre dos filamentos gruesos (fig. 9-56*b*). Los cortes longitudinales revelan la presencia de proyecciones de los filamentos gruesos a intervalos regulares. Las proyecciones representan puentes capaces de formar uniones con los filamentos delgados vecinos.

El modelo de filamento deslizante de la contracción muscular

Todos los músculos esqueléticos operan por acortamiento; no hay otra forma en que puedan realizar un trabajo. Las unidades de acortamiento son las sarcómeras, cuya disminución de longitud combinada explica el acortamiento del músculo completo. El indicio más importante del mecanismo subyacente de la contracción muscular provino de observaciones del patrón de bandas de las sarcómeras en diferentes etapas del proceso contráctil. Cuando una fibra muscular se acorta, la banda A de cada sarcómera conserva una longitud constante, en tanto las bandas H e I disminuyen de anchura y luego desaparecen del todo. Conforme el acortamiento aumenta, las líneas Z de ambos extremos de la sarcómera se mueven hacia adentro hasta que tocan los bordes externos de la banda A (fig. 9-57).

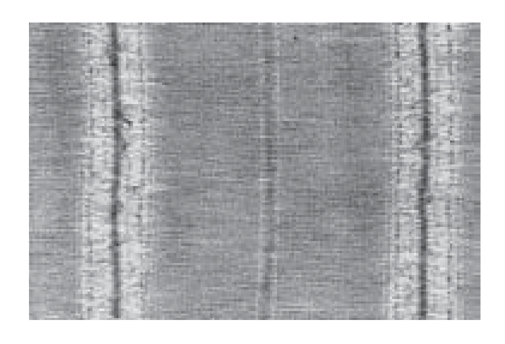
Con base en estas observaciones, dos grupos de investigadores británicos, Andrew Huxley y Ralph Niedergerke, y Hugh Huxley y Jean Hanson, propusieron en 1954 un modelo de gran alcance para explicar la contracción muscular. Postularon que el acortamiento de las sarcómeras individuales no se debía al acortamiento de los filamentos, sino al deslizamiento de unos





(a)

Zona H
Banda I



(b)

FIGURA 9-57 Acortamiento de la sarcómera durante la contracción muscular. *a*) Diagrama esquemático que muestra la diferencia en la estructura de la sarcómera en un músculo relajado y uno contraído. Durante la contracción, los puentes de miosina hacen contacto con los filamentos delgados circundantes y los filamentos delgados se ven forzados a deslizarse hacia el centro de la sarcómera. Los puentes funcionan de manera asincrónica, de modo que sólo una fracción está activa en un instante determinado. *b*) Micrografías electrónicas de cortes longitudinales a través de una sarcómera relajada (*arriba*) y contraída (*abajo*). Las micrografías muestran la desaparición de la zona H como resultado del deslizamiento de los filamentos delgados hacia el centro de la sarcómera. (*B*, TOMADA DE JAMES E. DENNIS/PHOTOTAKE.)

sobre otros. El deslizamiento de los filamentos delgados hacia el centro de la sarcómera produciría el aumento observado en la superposición de los filamentos y la disminución en la anchura de las bandas I y H (fig. 9-57). El *modelo de filamento deslizante* se aceptó en poco tiempo y la evidencia a su favor aún continúa en aumento.

La composición y la organización de los filamentos gruesos y delgados Además de la actina, los filamentos delgados de un músculo esquelético contienen otras dos proteínas, *tropomiosina* y *troponina* (fig. 9-58). La tropomiosina es una molécula alargada (de unos 40 nm de largo) que se ajusta con firmeza en las hendiduras dentro del filamento delgado. Cada molécula cilíndrica de tropomiosina se relaciona con siete subunidades de actina a lo largo del filamento delgado (fig. 9-58). La troponina es un complejo proteico globular formado por tres subunidades, cada una con una participación importante y distinta en la función general de la molécula. Las moléculas de troponina están dispuestas con una distancia aproximada de 40 nm entre ellas sobre el filamento delgado y establecen contacto con la actina y la tropomiosina del filamento. Los filamentos de actina de cada media sarcómera están alineados con sus extremos barbados unidos con la línea Z.

Cada filamento grueso está compuesto por varios cientos de moléculas de miosina II junto con pequeñas cantidades de otras proteínas. Al igual que los filamentos que se forman in vitro (véase fig. 9-51), la polaridad de los filamentos gruesos de las células musculares se invierte en el centro de la sarcómera. El centro del filamento se forma con las regiones de la cola de las moléculas de miosina opuestas y carece de cabezas. Las cabezas

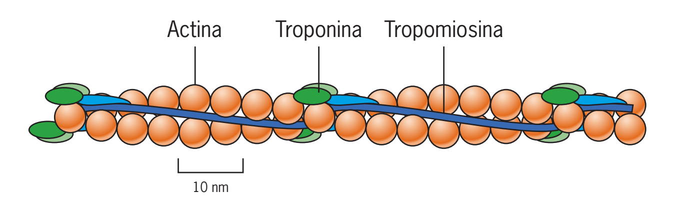


FIGURA 9-58 Organización molecular de los filamentos delgados. Cada filamento delgado consiste en un conjunto helicoidal de subunidades de actina con moléculas de tropomiosina de forma cilíndrica situadas en las hendiduras y moléculas de troponina situadas a intervalos espaciales definidos, como se describe en el texto. La figura 9-63 muestra los cambios en la posición de estas proteínas que inician la contracción.

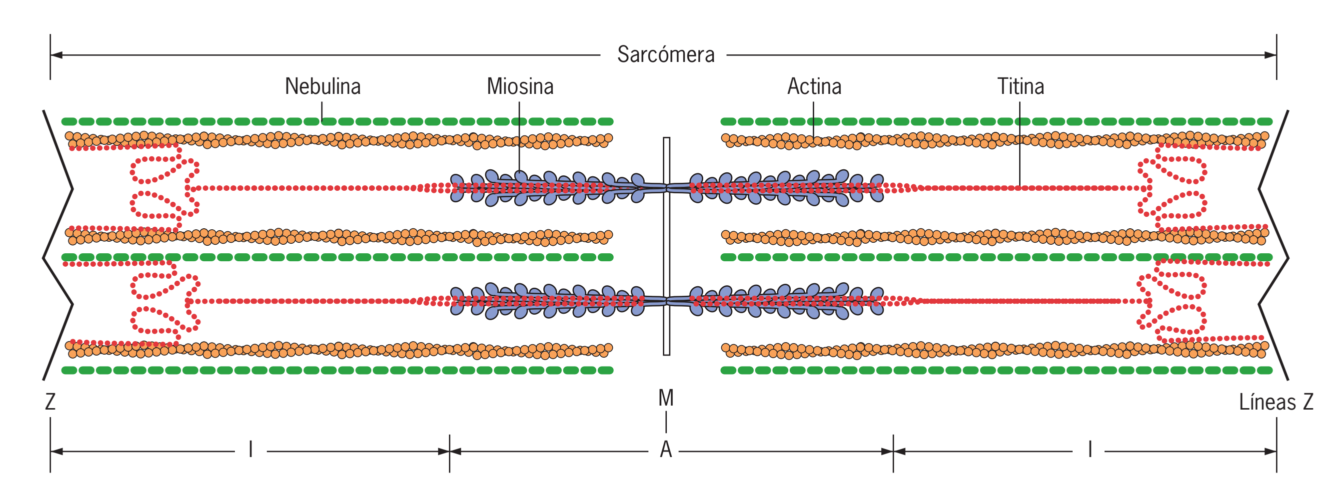


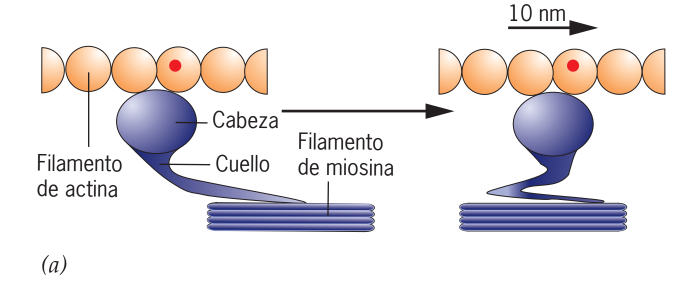
FIGURA 9-59 Disposición de las moléculas de titina dentro de la sarcómera. Estas enormes moléculas elásticas se extienden desde el final de la sarcómera en la línea Z a la banda M en el centro de la sarcómera. Se cree que las moléculas de titina mantienen los filamentos gruesos en el centro de la sarcómera durante la contracción. La porción de la banda I de la molécula de titina contiene dominios similares a resortes y tiene una gran elasticidad. Al parecer las moléculas de nebulina (que no se describen en el texto) actúan como una "regla molecular" porque regulan el número permitido de monómeros de actina que se ensamblan en un filamento delgado. (TOMADA DE T. C. S. KELLER, CURR OPIN CELL BIOL 7:33, 1995.)

de miosina sobresalen de cada filamento grueso en todo el resto de su extensión por la posición intercalada de las moléculas de miosina que componen el cuerpo del filamento (fig. 9-51).

La tercera proteína más abundante en los músculos esqueléticos de los vertebrados es la *titina*, que es la proteína más grande descubierta en cualquier organismo. Todo el gen de titina (que puede dar lugar a isoformas de distinta longitud) codifica un polipéptido con masa molecular mayor de 3.5 millones de daltones y que contiene más de 38 000 aminoácidos. Las moléculas de titina se originan en la línea M del centro de cada sarcómera y se extienden a lo largo del filamento de miosina, continúan después de la banda A y terminan en la línea Z (fig. 9-59). La titina es una proteína muy elástica que se estira como una liga cuando ciertos dominios dentro de la molécula se desdoblan. Se cree que la titina previene la rotura de la sarcómera durante el estiramiento muscular. También mantiene los filamentos de miosina en su posición apropiada al interior del centro de la sarcómera durante la contracción muscular.

La base molecular de la contracción Después de la formulación de la hipótesis del filamento deslizante, la atención se dirigió a las cabezas de las moléculas de miosina como los componentes generadores de fuerza de la fibra muscular. Durante una contracción cada cabeza de miosina se extiende hacia afuera y se une con firmeza al filamento delgado, con lo que se forman los puentes que se ven entre los dos tipos de filamentos (fig. 9-57). Las cabezas de un solo filamento de miosina interactúan con seis filamentos de actina circundantes. Mientras permanece unida con fuerza al filamento de actina, la cabeza de miosina sufre un cambio en la conformación (descrito más adelante) que mueve el filamento delgado de actina unos 10 nm hacia el centro de la sarcómera. A diferencia de la miosina V (que se muestra en la figura 9-52), la miosina muscular (miosina II) es un *motor no progresivo.* La miosina muscular permanece en contacto con su riel, el filamento delgado, sólo durante una pequeña fracción (menos de 5%) del ciclo completo. Sin embargo, cada filamento delgado entra en contacto con un equipo de casi 100 cabezas de miosina que se mueven en forma sincrónica (fig. 9-57*a*). Por consiguiente el filamento delgado realiza un movimiento continuo durante cada ciclo contráctil. Se estima que un solo filamento delgado de una célula muscular puede moverse varios cientos de nanómetros durante un intervalo de apenas 50 milisegundos.

Desde hace mucho tiempo los expertos en fisiología muscular buscan comprender cómo una sola molécula de miosina puede mover el filamento de actina unos 10 nm en un solo golpe de poder. La publicación de la primera estructura atómica del fragmento S1 de la miosina II realizada en 1993 por Ivan Rayment, Hazel Holden y sus colegas de la *Wisconsin University* enfocó la atención en una propuesta para explicar este mecanismo de acción. En esta hipótesis, la energía liberada por la hidrólisis del ATP induce un pequeño cambio en la conformación (0.5 nm) dentro de la cabeza mientras aún permanece unida con fuerza al filamento de actina. El pequeño movimiento dentro de la cabeza se amplifica después unas 20 veces con el balanceo del cuello helicoidal alfa adyacente (fig. 9-60). De acuerdo con esta hipótesis, el cuello alargado de la miosina II actúa como una "palanca rígida", lo que hace que el filamento de actina unido se deslice una distancia mucho mayor de la que sería posible de cualquier otra manera. Se cree que las dos cadenas ligeras, que se enredan alrededor del cuello, confieren rigidez a la palanca. El apoyo para la idea del "brazo de palanca" al principio se obtuvo de una serie de experimentos efectuados por James Spudich y sus colegas en la *Stanford University* . Estos investigadores construyeron genes que codificaban versiones alteradas de la molécula de miosina II, las cuales contenían cuellos de distintas longitudes. Luego las moléculas de miosina modificadas por ingeniería genética se probaron en un ensayo in vitro con filamentos de actina, similar a la prueba mostrada en la figura



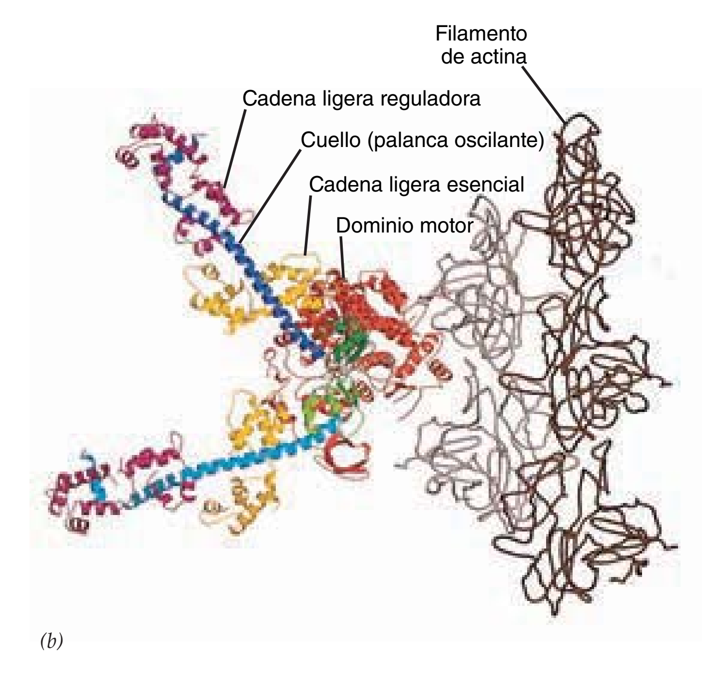


FIGURA 9-60 Modelo del brazo de palanca oscilante de una molécula de miosina II. *a*) Durante el movimiento de poder, el cuello de la molécula de miosina se mueve con una rotación aproximada de 90°, lo que produciría un movimiento del filamento de actina de unos 10 nm. *b*) Un modelo del movimiento de poder del dominio motor de la miosina consistente en el dominio motor (o cabeza) y el cuello adyacente (o brazo de palanca). Se muestra un filamento de actina unido en gris/café. El cuello helicoidal largo se muestra en dos posiciones, antes y después del movimiento de poder (mostrados como los cuellos azul oscuro superior y azul claro inferior, respectivamente). Este desplazamiento de la región del cuello es el que se cree que impulsa el movimiento de poder en el músculo. Las cadenas ligeras esenciales y reguladoras, que se enredan alrededor del cuello, se muestran en amarillo y magenta, respectivamente. (*B*, TOMADA DE MALCOLM IRVING ET AL. REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE NATURE STRUCT BIOL 7:482, 2000; © DERECHOS RESERVADOS 2000, MACMILLAN MAGAZINES, LTD.)

9-50. Como se esperaba con base en la hipótesis del brazo de palanca, la longitud aparente del golpe de poder de las moléculas de miosina resultó directamente proporcional a la longitud de sus cuellos. Las moléculas de miosina con cuellos más cortos generaron desplazamientos más breves, mientras que aquellas con cuello más largo produjeron un desplazamiento mayor. No todos los estudios apoyan la relación entre el tamaño del paso y la longitud del cuello, por lo que la función del brazo de palanca aún es tema de controversia.

La energética del deslizamiento del filamento Como las otras proteínas motoras cinesina y dineína, la miosina convierte la energía química del ATP en la energía mecánica del deslizamiento de un filamento. Cada ciclo de actividad mecánica del puente de miosina tarda unos 50 mseg y se acompaña de un ciclo de actividad de la ATP-asa, como se ilustra en el modelo de la figura 9-61. Según este modelo, el ciclo comienza cuando una molécula de ATP se une con la cabeza de miosina, un fenómeno que induce la disociación del puente con el filamento de actina (fig. 9-61, paso 1). La unión del ATP va seguida por su hidrólisis, que ocurre antes que la cabeza de miosina establezca contacto con el filamento de actina. Los productos de la hidrólisis del ATP, o sea ADP y P_i, permanecen unidos al sitio activo de la enzima, mientras la proteína completa absorbe la energía liberada por la hidrólisis (fig. 9-61, paso 2). En este momento el puente se halla en estado energético, análogo a un resorte estirado capaz de realizar un movimiento espontáneo. La miosina cargada de energía se une con la molécula de actina (paso 3) y libera el fosfato unido, lo que desencadena un gran cambio en la conformación impulsado por la energía libre que

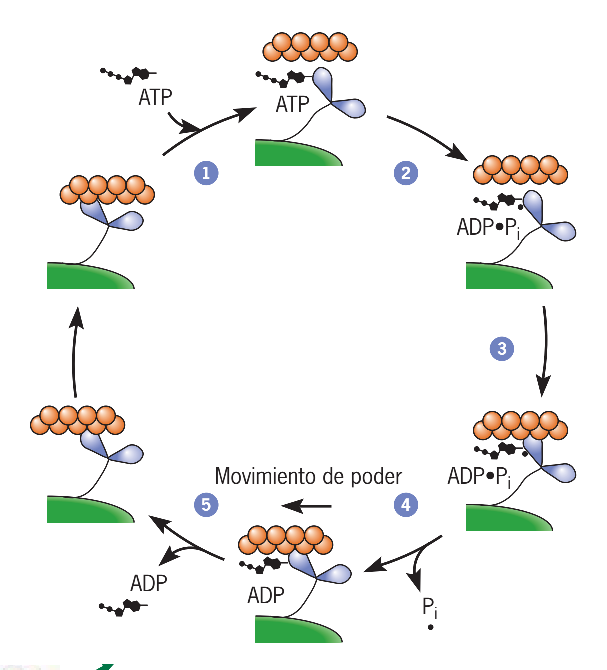


FIGURA 9-61 Modelo esquemático del ciclo contráctil de la actina-miosina. El movimiento del filamento delgado por la cabeza de miosina generadora de fuerza es resultado de la unión del ciclo mecánico que incluye unión, movimiento y desprendimiento de la cabeza, con el ciclo químico que implica unión, hidrólisis y liberación de ATP, ADP y P_i. En este modelo los dos ciclos comienzan en el paso 1 con la unión de ATP en la hendidura de la cabeza de miosina, lo que induce el desprendimiento de la cabeza del filamento de actina. La hidrólisis del ATP unido (paso 2) proporciona energía a la cabeza, por lo que ésta se une débilmente con el filamento de actina (paso 3). La liberación de P_i produce una unión más firme de la cabeza de miosina al filamento delgado y el movimiento de poder (paso 4) que desplaza el filamento delgado hacia el centro de la sarcómera. La liberación de ADP (paso 5) establece las condiciones para un nuevo ciclo. (TOMADA DE M. Y. JIANG Y M. P. SHEETZ, BIOESS 16:532, 1994.)

estaba almacenada (paso 4). Este cambio en la conformación mueve el filamento de actina hacia el centro de la sarcómera. Tal movimiento representa el golpe de poder de la cabeza de miosina que se muestra en la figura 9-60. A la liberación del ADP unido (paso 5) le sigue la unión de una nueva molécula de ATP para que un nuevo ciclo pueda iniciarse. En ausencia de ATP la cabeza de miosina permanece unida con fuerza al filamento de actina. La incapacidad de los puentes de miosina para desprenderse en ausencia de ATP es la base de la condición conocida como *rigor mortis*, la rigidez de los músculos que sigue a la muerte.

Coordinación de la excitación-contracción Las fibras musculares se organizan en grupos llamados *unidades motoras.* Todas las fibras de una unidad motora están inervadas por ramas de una sola neurona motora y se contraen en forma simultánea cuando reciben el estímulo de un impulso transmitido por esa neurona. El punto de contacto del extremo de un axón con una fibra muscular se llama **unión neuromuscular** (fig. 9-62; véase también la figura 4-54 para obtener una imagen más cercana de la estructura de la sinapsis). La unión neuromuscular es un sitio de transmisión del impulso nervioso del axón, a través de la hendidura sináptica y hasta la fibra muscular, cuya membrana plasmática también es excitable y capaz de conducir un potencial de acción.

Los pasos entre la llegada de un impulso nervioso a la membrana plasmática muscular y el acortamiento de las sarcómeras en la profundidad de la fibra muscular constituyen un proceso que se conoce como **coordinación de excitación-contracción**. A diferencia de una neurona, en la que el potencial de acción permanece en la superficie celular, el impulso generado en una célula muscular esquelética se propaga al interior de la célula por los pliegues membranosos llamados **túbulos transversos (T)** (fig. 9-62). Los túbulos T terminan muy cerca de un sistema de membranas citoplásmicas que conforman el **retículo sarcoplásmico** (**SR**), que forma una manga membranosa alrededor de la miofibrilla. Cerca de 80% de la proteína integral de la membrana del SR consiste en moléculas de ATP-asa-Ca^{2+} cuya función es transportar el calcio fuera del citosol y hacia la luz del SR, donde se almacena hasta que se necesite.

La importancia del calcio en la contracción muscular se demostró por primera vez en 1882, cuando Sydney Ringer, un médico inglés, encontró que el corazón aislado de una rana se contraía en solución salina con agua corriente de Londres, pero no sucedía lo mismo en una solución preparada con agua destilada. Ringer estableció que los iones de calcio presentes en el

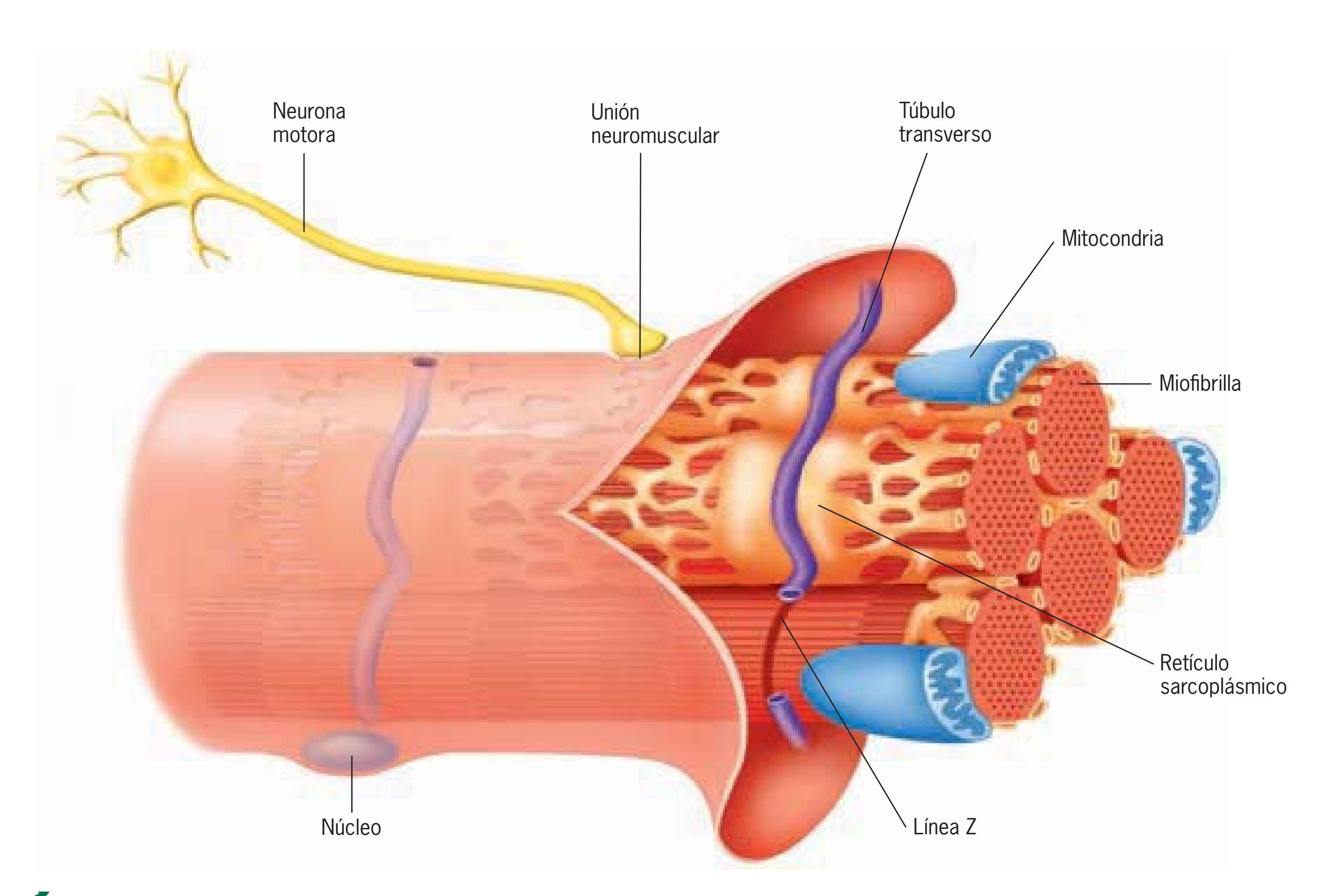


FIGURA 9-62 Anatomía funcional de una fibra muscular. El calcio se aloja en la elaborada red de membranas internas que conforman el retículo sarcoplásmico (SR). Cuando llega un impulso a través de una neurona motora, se transporta al interior de la fibra por el túbulo transverso al SR. Las compuertas de calcio del SR se abren, lo que libera el calcio hacia el citosol. La unión de iones calcio con las moléculas de troponina de los filamentos delgados origina los fenómenos descritos en la figura siguiente y la contracción de la fibra.

agua corriente eran un factor esencial en la contracción muscular. Los niveles de calcio dentro del citoplasma de una fibra muscular son muy bajos (alrededor de 2×10^{-7} M) en el estado relajado, menores a la concentración umbral necesaria para la contracción. Con la llegada de un potencial de acción a través de los túbulos transversos, los canales del calcio de la membrana del SR se abren y el calcio sale del compartimiento del SR y recorre la corta distancia hasta las miofibrillas. Como resultado los niveles intracelulares de Ca^{2+} se elevan a cerca de 5×10^{-5} M. Para comprender el modo en que los niveles altos de calcio desencadenan la contracción en una fibra de músculo esquelético es necesario reconsiderar la estructura proteica de los filamentos delgados.

Cuando la sarcómera está relajada, las moléculas de tropomiosina de los filamentos delgados (véase fig. 9-58) bloquean los sitios de unión de la miosina en las moléculas de actina. La posición de la tropomiosina dentro de la hendidura está bajo el control de la molécula de troponina unida. Cuando los niveles de calcio se elevan, estos iones se unen con una de las subunidades de troponina (troponina C) e inducen un cambio en la conformación en otra subunidad de la molécula de troponina. Como el colapso de una torre de fichas de dominó, el movimiento de la troponina se transmite a la tropomiosina adyacente, que se acerca unos 1.5 nm al centro de la hendidura del filamento (de la posición b a la posición a en la figura 9-63). Este cambio en la posición de la tropomiosina expone los sitios de unión para miosina en las moléculas adyacentes de actina. Cada molécula de troponina controla la posición de una molécula de tropomiosina, que a su vez regula la capacidad de unión de siete subunidades de actina en el filamento delgado.

Una vez que la estimulación de la fibra nerviosa motora cesa, los canales del calcio de la membrana del SR se cierran y las moléculas de Ca^{2+}-ATP-asa de esa membrana retiran el exceso de calcio del citosol. Conforme la concentración de Ca^{2+} disminuye, estos iones se separan de sus sitios de unión en la troponina, lo que ocasiona que las moléculas de tropomiosina regresen a una posición en la que bloquean la interacción entre actina y miosina. El proceso de relajación puede considerarse una competencia por el calcio entre la proteína de transporte de la membrana del SR y la troponina. La proteína de transporte tiene una mayor afinidad por el ion, por lo que la tendencia se dirige a retirar el calcio del citosol y dejar las moléculas de troponina sin calcio.

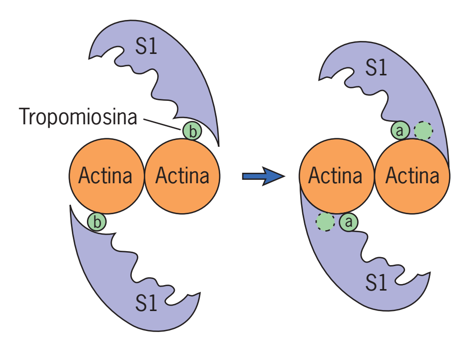


FIGURA 9-63 Función de la tropomiosina en la contracción muscular. Esquema del modelo del obstáculo estérico en el que el sitio de unión para la miosina en los filamentos delgados de actina está controlado por la posición de la molécula de tropomiosina. Cuando los niveles de calcio se elevan, la interacción entre el calcio y la troponina (no se muestra) da origen al movimiento de la tropomiosina de la posición b a la posición a, lo que deja expuesto el sitio de unión del filamento delgado para la cabeza de miosina.

REVISIÓN ?

1. Describa la estructura de la sarcómera de una miofibrilla de músculo esquelético y los cambios que ocurren durante su contracción.
2. Describa los pasos que ocurren entre el momento en que un impulso nervioso se transmite a través de una unión neuromuscular y el momento en que la fibra muscular en realidad empieza a acortarse. ¿Cuál es la función de los iones de calcio en el proceso?

9.7 MOVILIDAD EXTRAMUSCULAR

Las células del músculo esquelético son un sistema ideal para el estudio de la contractilidad y el movimiento porque las proteínas que interactúan están presentes en altas concentraciones y son parte de estructuras celulares definidas. El estudio de la movilidad extramuscular es más desafiante porque los componentes tienden a encontrarse en formas menos ordenadas, más lábiles y transitorias. Aún más, casi siempre se limitan a una *corteza* delgada justo debajo de la membrana plasmática. La corteza es una región activa de la célula, encargada de procesos como la ingestión de materiales extracelulares, la extensión de prolongaciones durante el movimiento celular y la constricción de una sola célula animal en dos células hijas durante la división celular. Todos estos procesos dependen del ensamble de microfilamentos en la corteza.

En las páginas siguientes se presentan varios ejemplos de contractilidad y movilidad extramusculares que dependen de filamentos de actina y, en algunos casos, de miembros de la superfamilia de la miosina. Sin embargo, primero es importante revisar los factores que regulan la velocidad de ensamble, la cantidad, la longitud y los patrones espaciales de los filamentos de actina.

Proteínas de unión con la actina

La actina purificada puede polimerizarse in vitro para formar filamentos de actina, pero estos filamentos no pueden interactuar entre sí ni realizar actividades útiles. Bajo el microscopio se parecen al piso de un granero cubierto con paja. En cambio, los filamentos de actina de las células vivas se organizan en varios patrones, inclusive varios tipos de haces, redes delgadas (bidimensionales) y gelatinas tridimensionales complejas (fig. 9-64). La organización y el comportamiento de los filamentos de actina dentro de las células depende de una notable variedad de **proteínas de unión con actina** que afectan el ensamble o desensamble de estos filamentos, sus propiedades físicas y sus interacciones entre sí y con otros organelos celulares. Se han aislado más de 100 proteínas diferentes de unión con actina que pertenecen a muchas familias en varios tipos celulares. Las pro-

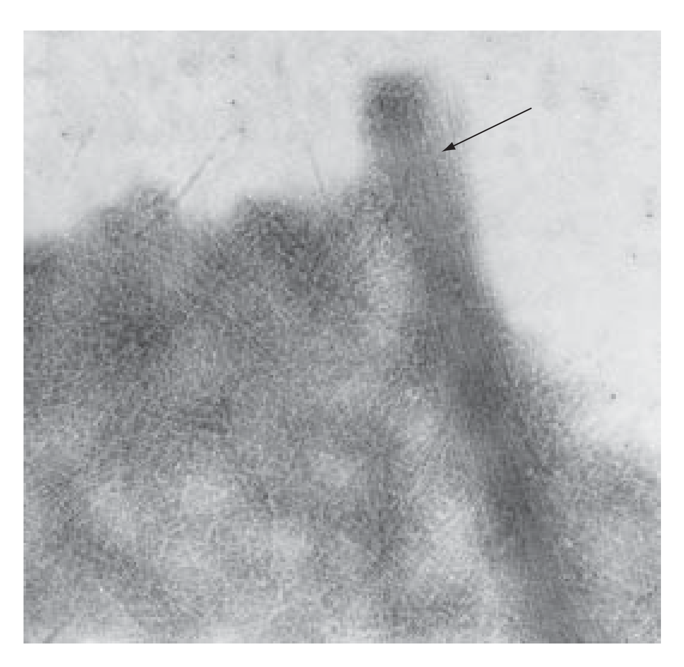


FIGURA 9-64 Dos disposiciones distintas de los filamentos de actina dentro de una célula. Como se describe más adelante en este capítulo, las células se mueven sobre un sustrato mediante la extensión de varios tipos de procesos. Esta micrografía electrónica del borde de avance de un fibroblasto móvil muestra la alta densidad de los filamentos de actina. Se ve que estos filamentos están organizados en dos conjuntos distintos: como haces en los que los filamentos se disponen en forma paralela entre sí (flecha) y como red con uniones cruzadas en la que los filamentos se disponen en varias direcciones. (CORTESÍA DE J. VICTOR SMALL.)

teínas de unión con actina pueden dividirse en varias categorías según su presunta función en la célula (fig. 9-65).[4]

1. ***Proteínas de nucleación.*** El paso más lento en la formación de un filamento de actina es el primero, la nucleación, que requiere la unión de por lo menos dos o tres monómeros de actina en la orientación apropiada para iniciar la formación del polímero. Este es un proceso muy poco favorable si se deja solas a las moléculas de actina. Como se mencionó antes, la formación de un filamento de actina se acelera en presencia de una semilla o núcleo preexistente al que puedan agregarse monómeros (como en la figura 9-46*a*). Se han identificado varias proteínas que promueven la nucleación de filamentos de actina. La mejor estudiada es el *complejo Arp2/3*, que contiene dos "proteínas relacionadas con actina", esto es, proteínas que comparten considerable homología de secuencia con las actinas, pero no se consideran actinas "verdaderas". Una vez que el complejo se activa, se cree que las dos Arp adoptan una conformación que constituye una plantilla a la cual pueden agregarse monómeros de actina, de modo análogo a como se propone que la tubulina γ forma una plantilla para la nucleación de un microtúbulo (fig. 9-20*c*). Como se expone en la página 379, el complejo Arp2/3 genera redes de filamentos de actina ramificados cortos. Otra proteína de nucleación, llamada *formina*, genera filamentos no ramificados, como los que se

[4] Hay que señalar que algunas de estas proteínas pueden efectuar más de uno de los tipos de actividades mencionadas, según la concentración de proteína para unión con actina y las condiciones prevalecientes (p. ej., la concentración de Ca^{2+} y H^+). La mayoría de los estudios de estas proteínas se realizan in vitro y a menudo resulta difícil extender los resultados a las actividades dentro de la célula.

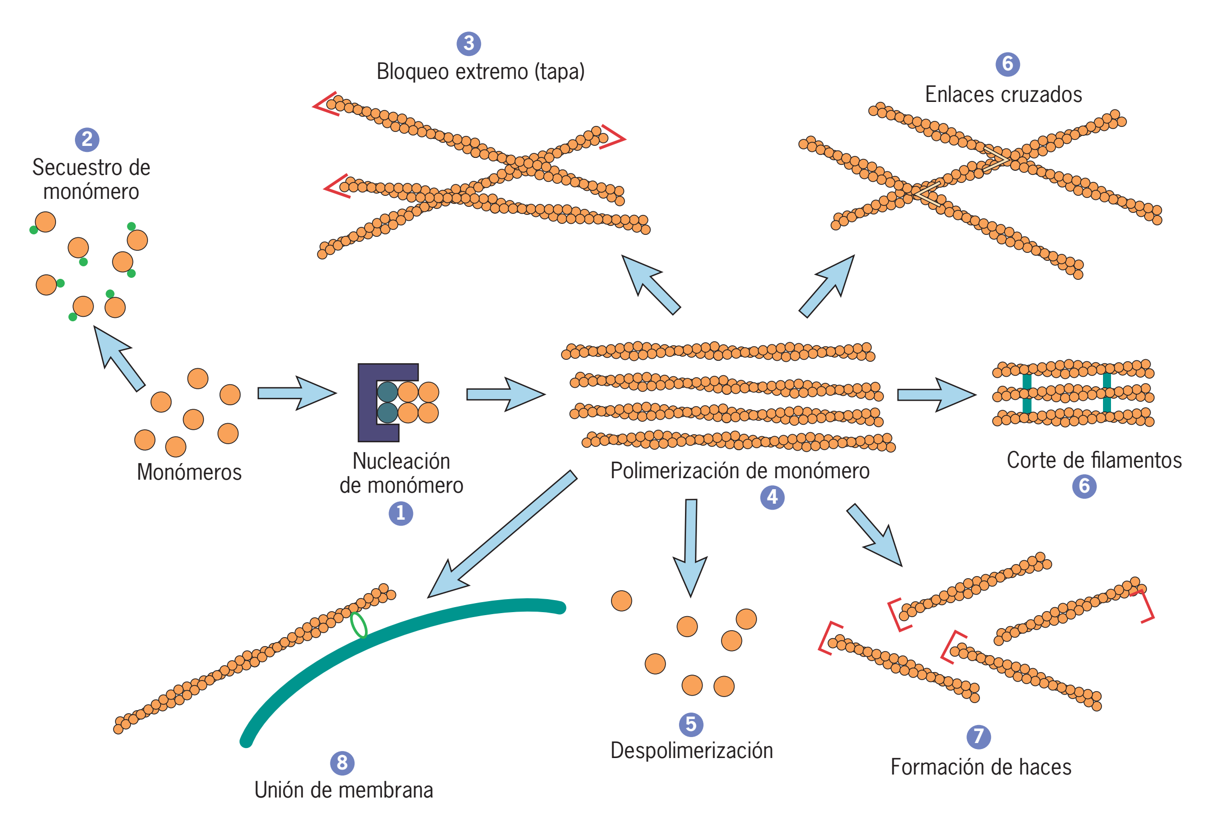


FIGURA 9-65 Funciones de las proteínas de unión con actina.

hallan en adhesiones focales (pág. 252) y en los anillos contráctiles de células en división (sección 14.2). A diferencia de Arp2/3, que permanece en el extremo aguzado del filamento recién formado, la formina sigue el extremo barbado incluso cuando se insertan unidades nuevas en ese sitio.

2. ***Proteínas para secuestro de monómeros.*** Las timosinas (p. ej., timosina-β_4) son proteínas que se unen con los monómeros actina-ATP (a menudo llamada *actina G*) e impiden la polimerización. Las proteínas con esta actividad se describen como proteínas para secuestro de monómeros de actina. Se cree que son las encargadas de mantener la concentración relativamente alta de actina G en células extramusculares (50 a 200 mM). Sin las proteínas para secuestro de monómeros, las condiciones en el citoplasma favorecerían la polimerización casi completa de los monómeros solubles de actina en filamentos. A causa de su capacidad para unirse con actina G y estabilizar la reserva de monómeros, los cambios en la concentración o la actividad de las proteínas para secuestro de monómeros puede modificar el equilibrio entre monómeros y polímeros en cierta región de una célula y determinar si en un momento determinado se favorece la polimerización o la despolimerización.
3. ***Proteínas bloqueadoras de los extremos (tapas).*** Las proteínas de este grupo regulan la longitud de los filamentos de actina al unirse con uno u otro extremo de los filamentos, formando una tapa que bloquea tanto la pérdida como la ganancia de subunidades. Si el extremo barbado de crecimiento rápido de un filamento se tapa, la despolimerización puede proceder en el extremo contrario, lo que conduce al desensamble del filamento. Si el extremo afilado también se tapa, la despolimerización se bloquea. Los filamentos delgados del músculo estriado se tapan en su extremo barbado en la línea Z por una proteína llamada capZ y en su extremo afilado lo hacen con la proteína tropomodulina. Si la tapa de tropomodulina se altera mediante la microinyección de anticuerpos en una célula muscular, los filamentos delgados agregan subunidades de actina adicionales en este extremo afilado recién descubierto y se observa una elongación drástica en la parte media de la sarcómera.
4. ***Proteínas polimerizadoras de monómeros.*** La profilina es una pequeña proteína que se une con el mismo sitio que la timosina en el monómero de actina. Sin embargo, en lugar de inhibir la polimerización, al parecer la profilina promueve el crecimiento de los filamentos de actina. La profilina lo hace mediante la unión con un monómero de actina, donde cataliza la disociación del ADP unido, que se sustituye en poco tiempo con un ATP. El monómero profilina-ATP-actina puede entonces ensamblarse sobre el extremo barbado libre de un filamento de actina, lo que conduce a la liberación de profilina.
5. ***Proteínas despolimerizadoras del filamento de actina.*** Los miembros de la familia proteica de la cofilina (que incluye cofilina, ADF y depactina) se unen con las subunidades actina-ADP presentes en el cuerpo y en el extremo afilado de los filamentos de actina (fig. 18-33). La cofilina tiene dos actividades evidentes: puede fragmentar los filamentos de actina y puede promover su despolimerización en el extremo afilado. Estas proteínas participan en el recambio rápido de los filamentos de actina en sitios de cambios dinámicos de la estructura del citoesqueleto. Son esenciales para la locomoción celular, la fagocitosis y la citocinesis.
6. ***Proteínas que forman enlaces cruzados.*** Las proteínas de este grupo pueden alterar la organización tridimensional de una población de filamentos de actina. Cada una de estas proteínas tiene dos o más sitios de unión con actina, por lo que pueden establecer enlaces entre dos o más filamentos de actina separados. Algunas de estas proteínas (p. ej., la filamina) tienen la forma de un cilindro largo y flexible, y promueven la formación de redes laxas de filamentos interconectados entre sí en ángulos casi rectos (como en la figura 9-64). Las regiones del citoplasma que contienen estas redes poseen las propiedades de un gel elástico tridimensional que resiste las presiones mecánicas locales. Otras proteínas que forman enlaces (p. ej., vilina y fimbrina) tienen forma globular y promueven el agrupamiento de filamentos de actina en conjuntos paralelos muy ajustados. Estas estructuras se encuentran en las microvellosidades que se proyectan de ciertas células epiteliales (fig. 9-66) y los estereocilios parecidos a pelos (fig. 9-54) que sobresalen de las células receptoras del oído interno. La agrupación de filamentos aumenta su rigidez, lo que les permite actuar como un esqueleto interno de soporte para estas proyecciones citoplásmicas.
7. ***Proteínas cortadoras de filamentos.*** Las proteínas de esta clase tienen la capacidad para unirse con el lado de un filamento ya formado y romperlo en dos. Las proteínas cortadoras (p. ej., la gelsolina) también pueden favorecer la incorporación de monómeros de actina mediante la creación de más extremos barbados libres, aunque también es posible que tapen los

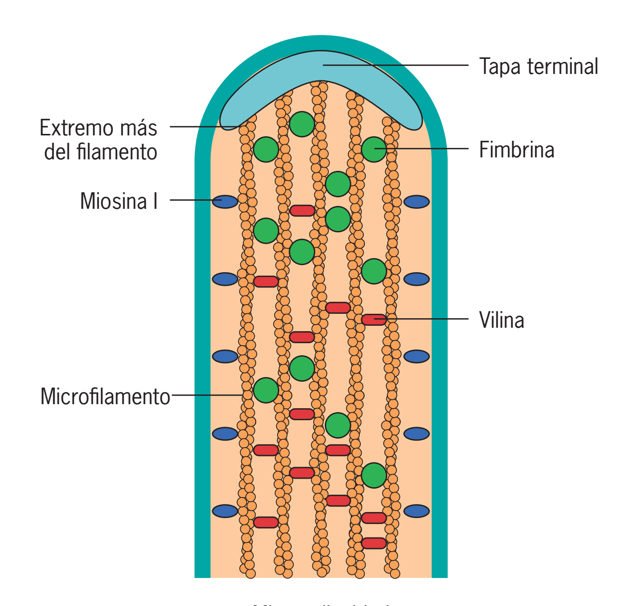


FIGURA 9-66 Filamentos de actina y proteínas fijadoras de actina en una microvellosidad. Las microvellosidades se reconocen sobre la superficie apical de los epitelios cuya función consiste en absorber solutos, como sucede con la superficie luminal del intestino y la pared de los túbulos renales. Los filamentos de actina son mantenidos en una disposición altamente ordenada por las proteínas empacadoras vilina y fimbrina. La función de la miosina I, la cual se dispone entre la membrana plasmática de la microvellosidad y los filamentos de actina periféricos, permanece desconocida.

extremos que generan. Como se indica en la figura 9-71, la cofilina también es capaz de cortar filamentos.

8. ***Proteínas de unión con membrana.*** Gran parte de la maquinaria contráctil de las células extramusculares radica justo debajo de la membrana plasmática. Durante muchas actividades, las fuerzas generadas por las proteínas contráctiles actúan sobre la membrana plasmática y hacen que sobresalga (como ocurre, por ejemplo, durante la locomoción celular) o que se invagine (como sucede durante la fagocitosis o la citocinesis). Por lo general estas actividades se facilitan por la unión indirecta de los filamentos de actina con la membrana plasmática mediante el enlace con una proteína periférica de membrana. En capítulos previos se describieron dos ejemplos: la inclusión de polímeros cortos de actina en el esqueleto de la membrana de los eritrocitos (véase fig. 4-31*d*) y la unión de los filamentos de actina con la membrana en las adhesiones focales y las uniones adherentes (véanse figs. 7-17 y 7-26). Las proteínas que unen las membranas con la actina comprenden la vinculina, miembros de la familia ERM (ezrina, radixina y moesina) y miembros de la familia de la espectrina (inclusive la distrofina, la proteína cuyo defecto causa la distrofia muscular).

Ejemplos de movilidad y contractilidad extramuscular

Los filamentos de actina, que a menudo trabajan en conjunto con los motores de miosina, son los encargados de varias actividades dinámicas en las células extramusculares, como la fagocitosis, la formación de corrientes citoplásmicas (flujo dirigido de citoplasma que ocurre en ciertas células vegetales grandes), el tráfico de vesículas, la activación de plaquetas, los movimientos laterales de proteínas integrales dentro de las membranas, las interacciones entre célula y sustrato, la locomoción celular, el crecimiento axónico y los cambios en la forma celular. Los ejemplos siguientes ilustran la movilidad y la contractilidad extramusculares.

Polimerización de la actina como mecanismo generador de fuerza Algunos tipos de motilidad celular ocurren sólo como resultado de la polimerización de la actina y no implican actividad de la miosina. Considérese el ejemplo de *Listeria monocytogenes,* una bacteria que infecta los macrófagos y puede causar encefalitis o intoxicación alimentaria. *Listeria* se impulsa como un cohete por el citoplasma de una célula infectada mediante la polimerización de monómeros de actina justo detrás de la bacteria (fig. 9-67). ¿Cómo puede esta bacteria inducir la

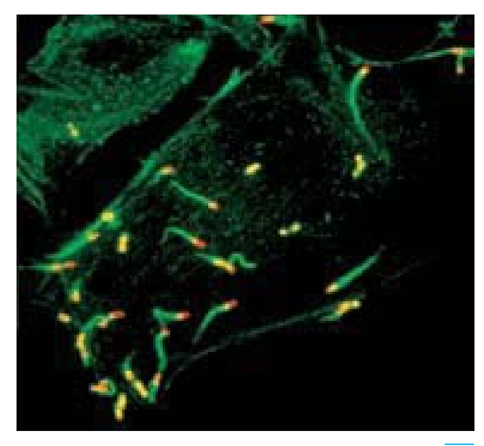


FIGURA 9-67 **La motilidad celular puede impulsarse por medio de la polimerización de la actina.** *a*) Micrografía por fluorescencia de una porción de una célula infectada con la bacteria *L. monocytogenes*. Las bacterias se ven como objetos teñidos de rojo, justo frente a las colas filamentosas de actina teñidas de verde. *b*) Micrografía electrónica de una célula infectada con la misma bacteria presentada en *a* que muestra los filamentos de actina que se forman detrás de la célula bacteriana y la empujan por el citoplasma. Los filamentos de actina tienen una apariencia atestada porque se decoraron con las cabezas de miosina. La barra que se encuentra arriba a la izquierda equivale a 0.1 µm. (*A*, CORTESÍA DE PASCALE COSSART; *B*, TOMADA DE LEWIS G. TILNEY ET AL., J CELL BIOL 118:77, 1992; MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

formación de filamentos de actina en un sitio particular de su superficie? Las preguntas respecto a la localización son importantes en el estudio de cualquier tipo de proceso móvil porque la motilidad depende de que una célula sea capaz de ensamblar la maquinaria necesaria en un sitio y momento particulares. *Listeria* puede realizar esta hazaña porque contiene una proteína llamada ActA que sólo se encuentra en un extremo de la bacteria. Cuando ActA queda expuesta dentro del citoplasma del hospedador, recluta y activa varias proteínas del hospedador (inclusive el complejo Arp2/3 descrito antes) que trabajan juntas para dirigir el proceso de polimerización de actina. El proceso de propulsión de *Listeria* se reconstruyó in vitro y ello permitió a los investigadores demostrar de manera concluyente que la polimerización de la actina por sí misma, sin la participación de motores de miosina, puede brindar la fuerza necesaria para la motilidad.

Los mismos fenómenos que ocurren durante la propulsión de *Listeria* se utilizan en las actividades celulares normales; van desde la propulsión de vesículas citoplásmicas y organelos hasta el movimiento de las células mismas, que es el tema de la sección siguiente.

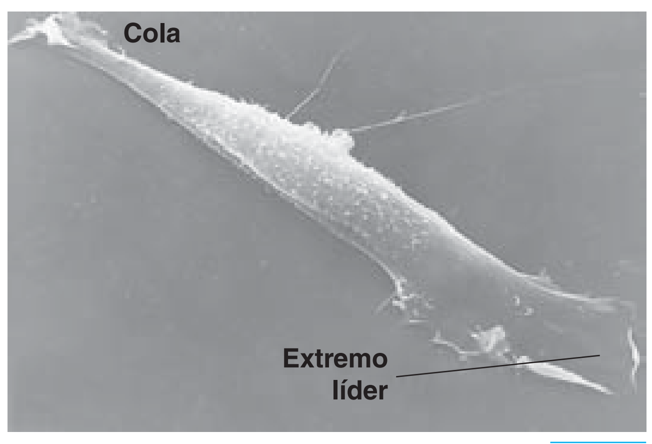


FIGURA 9-68 Micrografía electrónica de barrido de un fibroblasto de ratón que se arrastra sobre la superficie de una caja de cultivo. El borde de avance de la célula se extiende en un lamelipodio aplanado cuya estructura y función se explican más adelante. (Tomada de Guenter Albrecht-Buehler, Int Rev Cytol 120:194, 1990.)

Locomoción celular La locomoción celular es necesaria para muchas actividades en los vertebrados superiores, inclusive el desarrollo de tejidos y órganos, la formación de vasos sanguíneos, el desarrollo de axones, la cicatrización de heridas y la protección contra infecciones. La locomoción celular también es la encargada de la diseminación de tumores cancerosos. La siguiente descripción se concentra en estudios de células cultivadas que se mueven sobre un sustrato plano (bidimensional) porque estas son las condiciones experimentales que dominan este campo de investigación. Hay que tener presente que las células del cuerpo no se mueven sobre sustratos desnudos y planos, y que cada vez se tiene más evidencia de que algunos de los hallazgos de estos estudios tal vez no se apliquen a las células que cruzan un terreno más complicado. Hace poco tiempo los investigadores empezaron a desarrollar sustratos más complejos, entre ellos varios tipos de matrices extracelulares tridimensionales, que podrían conducir a la revisión de algunos aspectos del mecanismo de locomoción celular que se describen enseguida.

La figura 9-68 muestra un solo fibroblasto que se encontraba en el proceso de moverse hacia la esquina inferior derecha del campo cuando se preparó para el examen microscópico. La locomoción celular, como la que muestra el fibroblasto de la figura 9-68, comparte propiedades con otros tipos de locomoción, como la marcha. Cuando una persona camina, el cuerpo realiza una serie de actividades repetitivas: primero, se extiende una pierna en la dirección de la locomoción; segundo, la planta del pie hace contacto con el suelo, que actúa como punto de adhesión transitoria; tercero, los músculos de las piernas generan fuerza que mueve todo el cuerpo hacia adelante, más allá del pie estacionario; cuarto, el pie, que ahora está detrás del cuerpo, y no al frente, se levanta del piso como anticipación al siguiente paso. Aunque las células móviles puedan asumir formas muy distintas mientras se arrastran sobre el sustrato, presentan una secuencia similar de actividades (fig. 9-69). 1) El movimiento inicia por la protrusión de una parte de la superficie celular en la dirección en la que la célula va a moverse. 2) Una parte de la superficie inferior de la protrusión se adhiere al sustrato y forma sitios de anclaje temporal. 3) La mayor parte de la célula se impulsa al frente sobre los contactos adhesivos, que al final se convierten en la parte posterior de la célula. 4) La célula rompe los contactos traseros con el sustrato, lo que causa la retracción del margen final o “cola”.

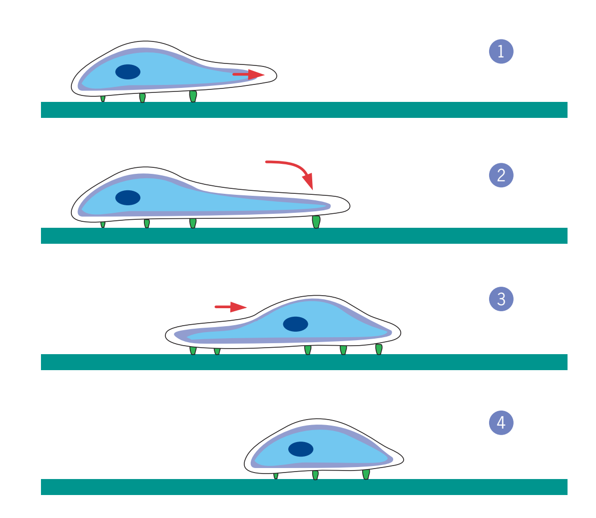
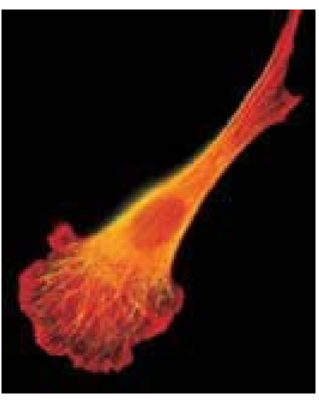
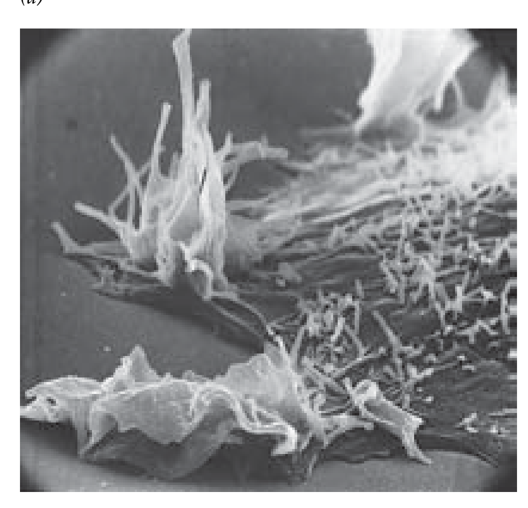


FIGURA 9-69 Secuencia repetitiva de actividades que ocurre cuando una célula se arrastra sobre el sustrato. El paso 1 ilustra la protrusión del borde líder de la célula en forma de un lamelipodio. El paso 2 muestra la adhesión de la superficie inferior del lamelipodio al sustrato, adhesión mediada por integrinas que se encuentran en la membrana plasmática. La célula utiliza esta adhesión para sujetarse al sustrato. El paso 3 ilustra el movimiento de la mayor parte de la célula hacia adelante sobre el sitio de adhesión, que permanece relativamente estacionario. Este movimiento se realiza mediante una fuerza contráctil (de tracción) ejercida contra el sustrato. El paso 4 muestra la célula después de romper la adhesión con el sustrato y cuando la parte posterior de la célula ya se llevó hacia el frente.

Células que se arrastran sobre el sustrato Cuando un pequeño fragmento de tejido vivo, como la piel o el hígado, se coloca en una caja de cultivo con medio de cultivo adecuado, algunas células individuales emigran del espécimen hacia la superficie de la caja. El examen de estas células bajo el microscopio casi siempre muestra que son fibroblastos, las células predominantes en el tejido conjuntivo (véase fig. 7-1). Conforme se mueve, el fibroblasto se aplana y aproxima mucho al sustrato, y adquiere una forma de abanico, con un borde frontal ancho y una "cola" estrecha (véase fig. 9-68). Su movimiento es errático y brusco, a veces avanza y otras se retira. En un buen día un fibroblasto puede avanzar cerca de 1 mm. La clave de la locomoción del fibroblasto se observa cuando se examina su borde frontal, que se extiende como una protrusión ancha, aplanada y semejante a un velo llamada **lamelipodio** (fig. 9-70*a*). Por lo general los lamelipodios carecen de vesículas citoplásmicas y otras estructuras en partículas, y a menudo el margen externo tiene un movimiento ondulante, lo que le confiere una apariencia arrugada (fig. 9-70*b*). Mientras el lamelipodio se extiende de la célula, se adhiere al sustrato subyacente en puntos específicos, lo que le brinda sitios de anclaje temporal para que la célula tire de sí misma hacia adelante.



(a)



(b)

FIGURA 9-70 Margen de avance de una célula móvil. *a*) El margen líder de este fibroblasto móvil se aplana contra el sustrato y se extiende en un lamelipodio semejante a un velo. *b*) Micrografía electrónica de barrido del margen de avance de una célula cultivada que muestra las membranas arrugadas del lamelipodio. (*A*, Cortesía de J. Victor Small; *B*, tomada de Jean Paul Revel, Symp Soc Exp Biol 28:447, 1974.)

En la página 377 se vio cómo la polimerización de los monómeros de actina puede brindar la fuerza que impulsa a una bacteria *Listeria* por el citoplasma. Este tipo de movimiento intracelular se realiza sin la participación de motores moleculares. Se cree que un tipo similar de mecanismo de polimerización de actina provee la fuerza motriz necesaria para la protrusión del borde líder de un lamelipodio. Este tipo de movilidad extramuscular también demuestra la importancia de las proteínas de unión con actina (mostradas en la figura 9-65) para orquestar el ensamble y desensamble de las redes de filamentos de actina en un sitio particular dentro de la célula en un momento determinado.

Supóngase que se inicia con un leucocito redondeado que recibe una señal química proveniente de un sitio particular en el que el cuerpo está herido. Una vez que el estímulo se recibe en la membrana plasmática, inicia la polimerización localizada de actina, que causa la polarización de la célula y su movimiento hacia la fuente del estímulo (fig. 9-71*a*).[5] Así como *Listeria* tiene una proteína (ActA) que activa la polimerización en la superficie celular bacteriana, las células de los mamíferos tienen una diversa familia de proteínas (la familia WASP) que activa el complejo Arp2/3 en el sitio de estimulación cerca de la membrana plasmática. La proteína WASP se descubrió como el producto de un gen causante del síndrome de Wiskott-Aldrich. El sistema inmunitario de los pacientes con este trastorno es defectuoso porque sus leucocitos carecen de proteína WASP funcional y por tanto no responden a las señales quimiotácticas.

La figura 9-71*b* muestra un modelo de los principales pasos en la formación de un lamelipodio que movería una célula en una dirección determinada. Se recibe un estímulo en un extremo de la célula (paso 1, fig. 9-71*b*) que conduce a la activación de complejos de proteína Arp2/3 por un miembro de la familia de proteínas WASP (paso 2). Los complejos Arp2/3 activados sirven como sitios de nucleación para la formación de nuevos filamentos de actina (paso 3). La polimerización de los monómeros de actina unidos con ATP en los extremos barbados libres del filamento en crecimiento se promueve mediante moléculas de profilina (pág. 376). Una vez que los nuevos filamentos de actina se forman, los complejos Arp2/3 se unen a los lados de estos filamentos (paso 4) y constituyen el núcleo para la formación de filamentos de actina adicionales que se forman como ramas (paso 5). Los complejos Arp2/3 permanecen en los extremos afilados, que se sitúan en los puntos de ramificación. Mientras tanto, la adición de una proteína tapa bloquea el crecimiento de los extremos barbados de los filamentos más antiguos (paso 5). En cambio, la adición de subunidades de actina a los extremos barbados de los filamentos más nuevos de la red empuja la membrana del lamelipodio hacia afuera, en la dirección del es-

[5] Este tipo de respuesta puede verse en una película notable en Internet que muestra un neutrófilo persiguiendo a una bacteria. Puede encontrarse con las palabras de búsqueda: "neutrophil crawling".

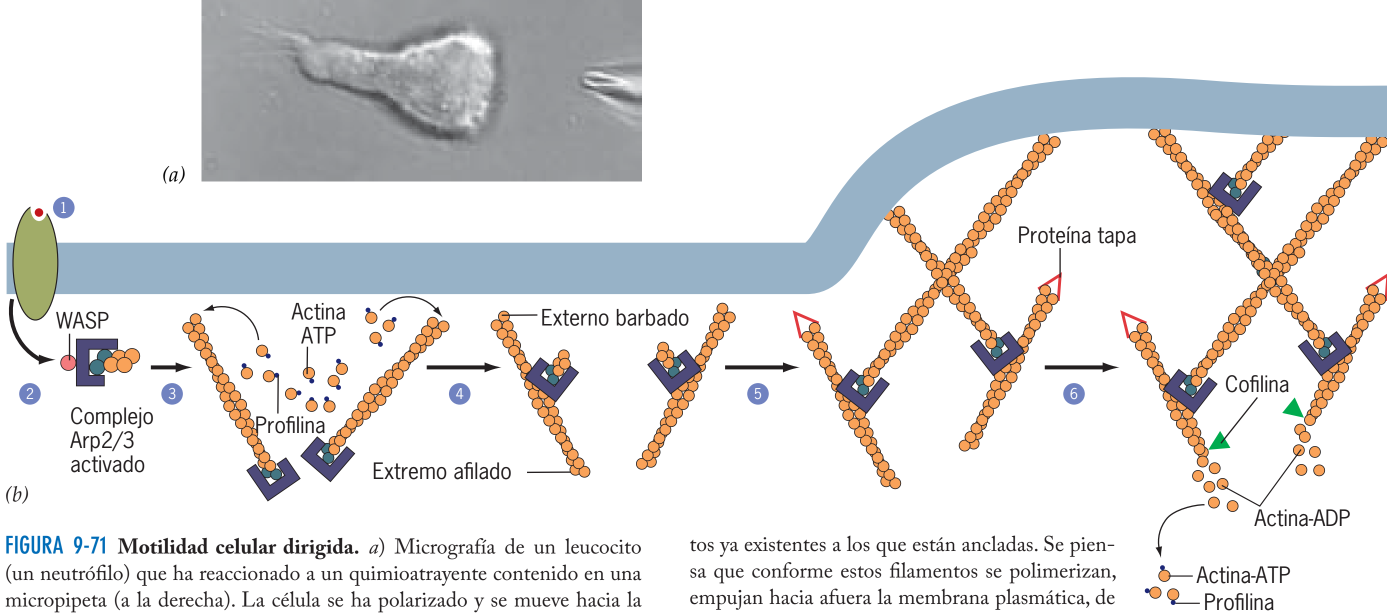


FIGURA 9-71 Motilidad celular dirigida. *a*) Micrografía de un leucocito (un neutrófilo) que ha reaccionado a un quimioatrayente contenido en una micropipeta (a la derecha). La célula se ha polarizado y se mueve hacia la fuente del estímulo. *b*) Un mecanismo propuesto para el movimiento de una célula de manera dirigida. Se recibe un estímulo en la superficie celular (paso 1), lo que ocasiona la activación del complejo Arp2/3 por un miembro de la familia WASP (paso 2). La molécula WASP realiza esta hazaña al unirse al complejo Arp2/3 y cambiar su conformación para parecerse a la superficie libre del extremo barbado de un filamento de actina. En consecuencia, los monómeros de ATP-actina libres se unen al complejo Arp2/3, lo que conduce a la formación de núcleos de filamentos de actina (paso 3). Una vez que se han formado los filamentos, los complejos Arp2/3 se unen a sus lados (paso 4), lo que estimula su actividad de nucleación. Como resultado los complejos Arp2/3 unidos inician las ramas laterales que se extienden hacia afuera (paso 5) a un ángulo aproximado de 70° en relación con los filamentos ya existentes a los que están ancladas. Se piensa que conforme estos filamentos se polimerizan, empujan hacia afuera la membrana plasmática, de lo que resulta la extensión del borde líder del lamelipodio. Mientras tanto el extremo barbado de los filamentos ya formados se une con una proteína tapa, la cual impide el crecimiento adicional de estos filamentos en una dirección inapropiada. Al final, el extremo aguzado de los filamentos de actina preexistentes sufre despolimerización, y se liberan subunidades de ADP-actina (paso 6). La despolimerización es promovida por la cofilina, la cual se une a las subunidades de ADP-actina dentro del filamento y estimula su separación del extremo aguzado del filamento. Las subunidades liberadas se unen a la profilina y se recargan por intercambio de ATP-ADP, lo que las deja listas para participar en la polimerización de la actina. (*A*, TOMADA DE CAROLE A. PARENT, CURR. OPIN. CELL BIOL. 16:5, 2004; COPYRIGHT 2004, CON AUTORIZACIÓN DE ELSEVIER SCIENCE.)

tímulo atrayente (pasos 5 y 6). Conforme los nuevos filamentos crecen por la adición de subunidades en sus extremos barbados, los filamentos tapados más antiguos se desensamblan a partir de sus extremos afilados (paso 6). La cofilina promueve el desensamble, ya que se une con las subunidades actina-ADP a lo largo de los filamentos (paso 6). Las subunidades actina-ADP liberadas de los filamentos que se desensamblan se recargan mediante la conversión en monómeros profilina-ATP-actina, que pueden reutilizarse en el ensamble de filamentos de actina en el borde líder.

La figura 9-72 ilustra algunas de las principales características estructurales de la locomoción celular. La micrografía electrónica de la figura 9-72 muestra la naturaleza ramificada y con puentes cruzados de la red filamentosa de actina que está justo debajo de la membrana plasmática de un lamelipodio en avance. Los insertos circulares de la figura 9-72 muestran una sucesión de ramas cortas de filamentos de actina, con complejos de Arp2/3 resaltados con una marca inmunitaria de oro. Se

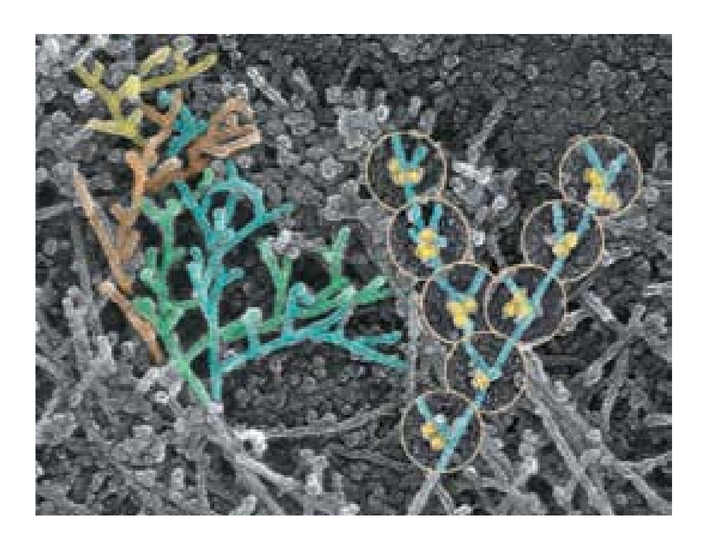


FIGURA 9-72 Base estructural de la extensión del lamelipodio. Micrografía electrónica de una réplica del citoesqueleto en el margen de avance de un fibroblasto móvil de ratón. Se observa que los filamentos de actina se disponen en una red ramificada que se coloreó para indicar los "árboles" individuales. Los insertos circulares muestran una sucesión de uniones con forma de Y entre los filamentos de actina ramificados. Los complejos Arp2/3 se localizan en la base de cada rama mediante anticuerpos unidos con partículas de oro coloidal (amarillo). (TOMADA DE TATYANA M. SVITKINA Y GARY G. BORISY; J CELL BIOL VOL. 145, NÚM. 5, 1999, MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

observa que los complejos Arp2/3 se encuentran en las uniones con forma de Y en las que los nuevos filamentos polimerizados se ramificaron de los filamentos preexistentes.

El movimiento del lamelipodio es un proceso dinámico. Mientras la polimerización y la ramificación de filamentos de actina continúan en el borde frontal del lamelipodio, los filamentos de actina se despolimerizan en la parte posterior del mismo (paso 6, fig. 9-71). Por tanto, si se considera como un todo, el filamento de actina completo experimenta un tipo de movimiento de noria (pág. 362) en el que las subunidades de actina se agregan a los extremos barbados de la estructura en la parte frontal y se pierden de los extremos afilados en la parte posterior.

De acuerdo con la secuencia de fenómenos mostrada en la figura 9-69, a la protrusión del borde líder la sigue el movimiento de toda la célula. Las principales fuerzas que participan en la locomoción celular son las generadas en los sitios de adhesión que se requieren para jalar o "arrastrar" el cuerpo principal de la célula hacia el frente (paso 3, fig. 9-69). A menudo se describen como "fuerzas de tracción" porque se producen en los sitios en los que la célula se sujeta al sustrato. Cuando se permite que las células migren sobre una hoja delgada de material elástico, los movimientos de las células se acompañan de deformación del sustrato (véase fig. 7-18). La magnitud de las fuerzas de tracción ejercidas en varios lugares en una célula migratoria viva puede calcularse a partir de los patrones dinámicos de la deformación del sustrato y representarse como se muestra en la figura 9-73. Como se ve al examinar esta imagen por computadora de un fibroblasto migratorio, las mayores fuerzas de tracción se ejercen justo detrás del borde líder de la célula, donde ésta se adhiere con firmeza al sustrato subyacente.[6] El cuerpo de la célula se adhiere con menor fuerza al sustrato, lo que permite arrastrarlo hacia el frente como un cargamento contenido.

Se dispone de mucha evidencia que indica que la polimerización de la actina es el fenómeno que empuja el borde líder de una célula hacia afuera (paso 1, fig. 9-69), mientras la miosina (junto con los filamentos de actina) es la encargada de jalar el resto de la célula hacia el frente (paso 3, fig. 9-69). Estas funciones contrastantes de la actina y la miosina se ilustran mejor en estudios con queratocitos de peces, que son células derivadas de la epidermis que cubre las escamas de los peces. Los queratocitos gozan de aceptación como sistemas para estudiar la locomoción porque su rápido movimiento de deslizamiento depende de la formación de un lamelipodio muy ancho y delgado. La figura 9-74 muestra un queratocito en movimiento que se fijó y tiñó para mostrar la actina (fig. 9-74*a*) y la miosina II (fig. 9-74*b*). Como se esperaba con base en la explicación previa, el borde de avance del lamelipodio está lleno de actina. Por otro lado, la miosina se concentra en una banda donde la parte trasera del lamelipodio se une con el resto de la célula. Las micrografías electrónicas de esta región muestran la presencia de cúmulos de pequeños filamentos bipolares de miosina II en la red de actina (fig. 9-74*c*). Se supone que las fuerzas contráctiles generadas por estas moléculas de miosina tiran del cuerpo celular detrás del lamelipodio líder. También se cree que la miosina I y otras miosinas no convencionales generan fuerzas para la locomoción celular en algunos organismos.

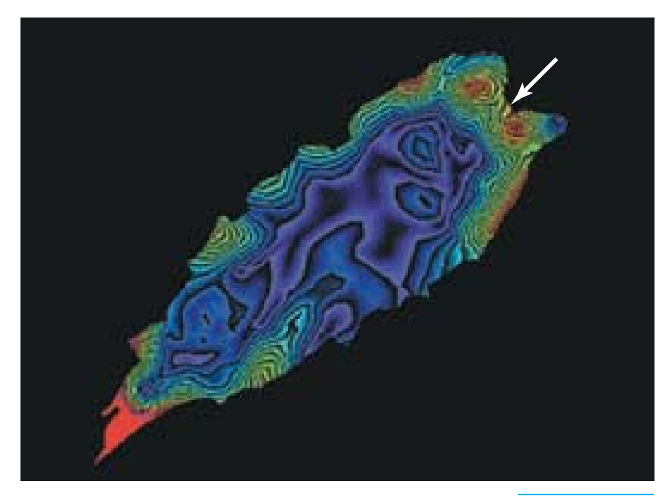


FIGURA 9-73 Distribución de las fuerzas de tracción dentro de un fibroblasto en movimiento. Conforme la célula migra, genera fuerzas de tracción contra su sustrato. Esta imagen presenta las fuerzas de tracción generadas por unidad de área por la superficie de un fibroblasto en movimiento. Las fuerzas de tracción se calculan en diferentes sitios de la superficie con base en el grado de deformación del sustrato (véase fig. 7-18). La magnitud de las fuerzas de tracción se expresa con la variación de colores; el rojo representa las fuerzas más intensas. Las mayores fuerzas se generan en sitios de pequeños complejos focales que se forman de manera transitoria detrás del margen líder de la célula, donde el lamelipodio se extiende (flecha). La deformación en la parte posterior de la célula (mostrada en rojo) se produce cuando el extremo frontal tira de manera activa de la cola, la cual tiene un anclaje pasivo. (Tomada de Karen A. Beningo et al., J Cell Biol 153:885, 2001, cortesía de Yu-Li Wang, mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

Crecimiento axónico Ross Harrison de la *Yale University* realizó uno de los experimentos clásicos de la biología en 1907. Harrison retiró un pequeño fragmento de tejido del sistema nervioso en desarrollo de un embrión de rana y lo colocó en una diminuta gota de líquido linfático. Observó el tejido al microscopio durante los días siguientes y encontró que las células nerviosas no sólo permanecían saludables, sino que muchas de ellas desarrollaban procesos que crecían hacia el medio circundante. Esta no sólo fue la primera ocasión en que las células se mantuvieron vivas en un cultivo hístico, sino que el experimento aportó evidencia importante de que los axones se desarrollan por un proceso de crecimiento y elongación activos.

La punta de un axón en elongación es muy distinta del resto de la célula (véase fig. 9-1*b*). A pesar de que la mayor parte del axón muestra poca evidencia externa de actividad móvil, la punta, o **cono de crecimiento**, se parece a un fibroblasto reptante de gran movilidad. Un análisis cuidadoso de un cono de

[6] La naturaleza de estos sitios de unión es motivo de gran controversia. Con frecuencia se describen como *complejos focales* para distinguirlos del complejo más grande de las adhesiones focales (véase fig. 7-17). Los complejos focales y las adhesiones focales comparten muchas de las mismas proteínas (integrinas, vinculina, talina, actina), pero estas últimas se relacionan con una unión celular estable, en lugar de adhesiones transitorias que ocurren durante la locomoción celular. Se cree que los complejos focales evolucionan en adhesiones focales cuando una célula deja de moverse y se vuelve estacionaria.

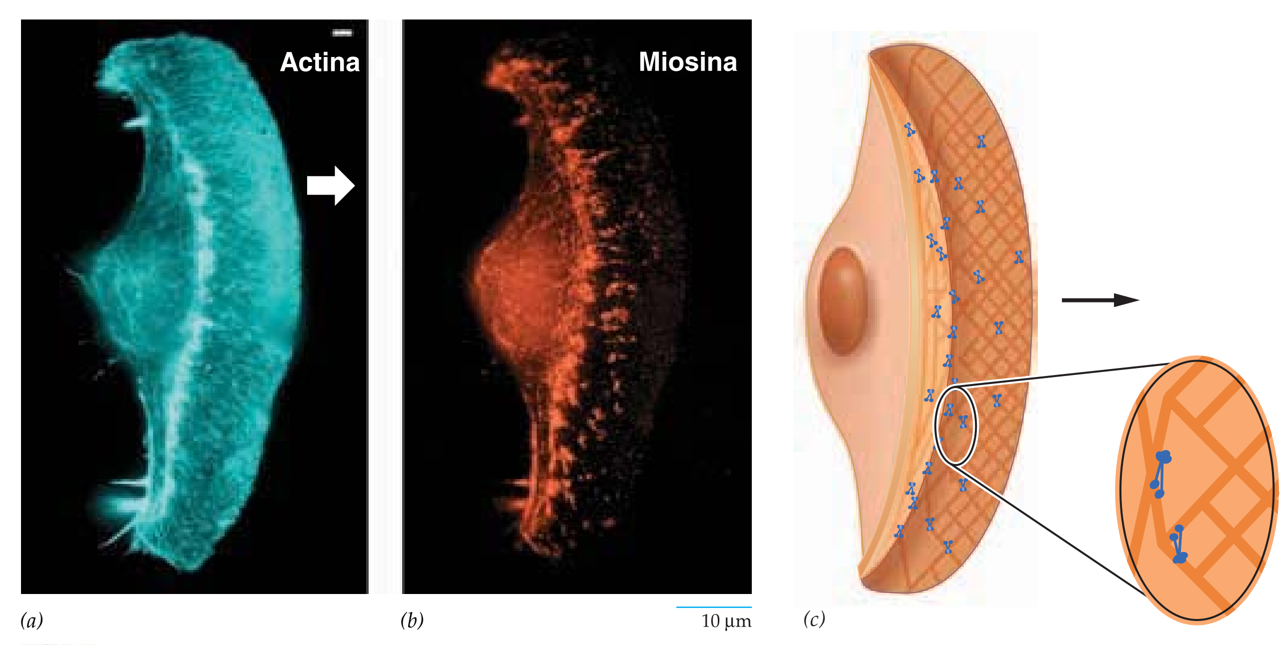
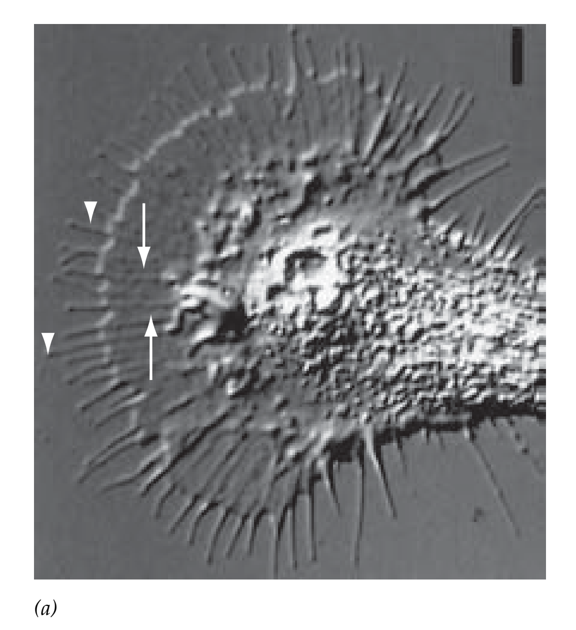


FIGURA 9-74 Funciones de la actina y la miosina en el movimiento por lamelipodio de los queratocitos de peces. *a* y *b*) Micrografías por fluorescencia de un queratocito de pez que se mueve sobre una caja de cultivo mediante un lamelipodio ancho y aplanado. La flecha muestra la dirección del movimiento, que puede ocurrir a velocidades de 10 µm/min. La distribución de la actina filamentosa se revela en la parte *a* que muestra la localización de la faloidina con marca fluorescente, que sólo se une con los filamentos de actina. La distribución de la miosina en la misma célula se revela en *b* que muestra la localización de los anticuerpos fluorescentes contra miosina. Resulta evidente que el cuerpo del lamelipodio contiene filamentos de actina, pero carece de miosina. Por su parte, la miosina se concentra en una banda que se encuentra justo detrás del lamelipodio, donde se une con el cuerpo de la célula. *c*) Dibujo que ilustra la red filamentosa de actina del lamelipodio y las interacciones entre actina y miosina hacia la parte posterior del lamelipodio. La red de actina se indica en rojo, las moléculas de miosina, en azul. (Por Alexander B. Verkhovsky, de Tatyana M. Svitkina et al., J Cell Biol 139:397,1997; mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)



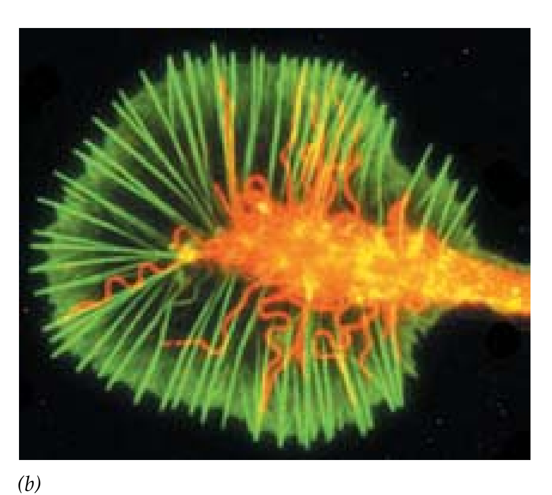
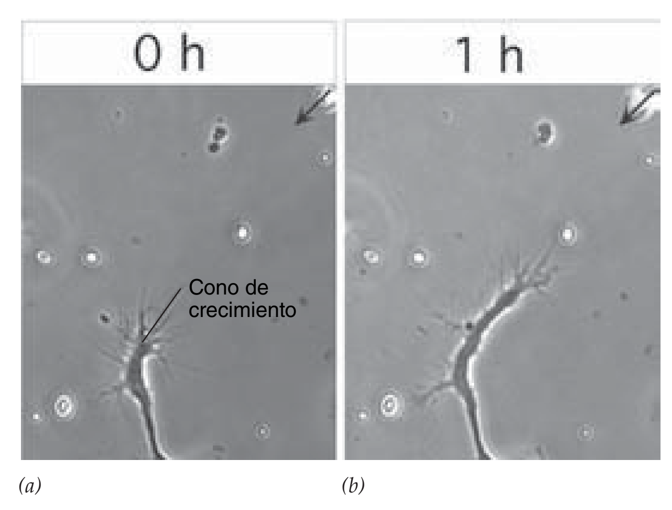


FIGURA 9-75 Estructura de un cono de crecimiento: la punta móvil de un axón en crecimiento. *a*) Imagen de video de un cono de crecimiento vivo. La terminación se extiende en un lamelipodio aplanado que se arrastra hacia adelante sobre el sustrato. Pueden verse microespigas cilíndricas (flechas) dentro del velo translúcido del lamelipodio, así como procesos finos llamados filopodios (puntas de flecha) que se proyectan hacia adelante del margen de avance del lamelipodio. La barra representa 5 µm. *b*) Micrografía por fluorescencia del cono de crecimiento de una neurona que muestra los filamentos de actina (verde) concentrados en el dominio periférico y los microtúbulos (naranja) concentrados en el dominio central. Pueden verse varios microtúbulos que invaden el dominio periférico, donde interactúan con haces de filamentos de actina. (*A*, tomada de Paul Forscher y Stephen J. Smith, J Cell Biol 107:1508, 1988; *B*, tomada de Feng-Quan Zhou, Clare M. Waterman-Storer y Christopher S. Cohan, J Cell Biol vol. 157, núm. 5, portada, 2002. Ambas mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)



(a) *(b)*

FIGURA 9-76 Movimientos dirigidos de un cono de crecimiento. Imagen de video de un cono de crecimiento vivo de una neurona de *Xenopus* que se desvió hacia una proteína difundible (netrina-1) liberada de una pipeta cuya posición se indica con la flecha. (Reimpresa con autorización de Elke Stein y Marc Tessier-Lavigne, Science 291:1929, 2001; © Derechos reservados 2001, American Association for the Advancement of Science.)

crecimiento vivo revela varios tipos de procesos locomotrices: un lamelipodio aplanado y ancho que se arrastra hacia afuera sobre el sustrato; *microespigas* cortas y rígidas (fig. 9-75*a*) que apuntan hacia afuera, al borde del lamelipodio, y *filópodos* muy alargados que se extienden y retraen en una exhibición continua de actividad móvil. La microscopia con fluorescencia muestra que todas estas estructuras en el dominio del cono de crecimiento están llenas de filamentos de actina (ilustrados en verde, fig. 9-75*b*). Se presume que estos filamentos de actina son los que explican las actividades móviles del cono de crecimiento. Por otro lado, los microtúbulos llenan el axón y el dominio central del cono de crecimiento, lo que brinda soporte al axón delgado que se alarga. Se observa que varios microtúbulos individuales penetran en la periferia rica en actina (mostrada en naranja, fig. 9-75*b*). Estos microtúbulos penetrantes son muy dinámicos y pueden tener una participación importante en la determinación de la dirección del crecimiento axónico.

El cono de crecimiento es una región muy móvil de la célula que explora su ambiente y alarga el axón. Dentro del embrión, los axones de las neuronas en desarrollo crecen a lo largo de trayectos definidos, siguen ciertos rasgos topográficos del sustrato o responden a la presencia de ciertas sustancias que se difunden en su camino. Los lamelipodios y los filópodos del cono de crecimiento responden a la presencia de estos estímulos físicos y químicos, lo que hace que los axones que buscan el camino se dirijan hacia los factores atrayentes y lejos de los repulsivos. La figura 9-76*a* muestra una neurona cultivada cuya punta de avance hizo un desvío directo hacia una proteína difusible llamada netrina, que actúa como atrayente para los axones en crecimiento dentro del embrión joven. Al final el cableado correcto de todo el sistema nervioso depende de la asombrosa capacidad de los conos de crecimiento embrionarios para tomar las "decisiones" de dirección correcta que los conducen a los órganos blanco que deben inervar.

Cambios en la forma celular durante el desarrollo embrionario Cada parte del cuerpo tiene una forma y una arquitectura interna características que surgen durante el desarrollo embrionario: la médula espinal es un tubo hueco, el riñón se forma con túbulos microscópicos, cada pulmón está compuesto por espacios aéreos microscópicos, etc. Se necesitan muchas actividades celulares para el desarrollo de la morfología característica de un órgano, inclusive cambios programados en la forma celular. Los cambios presentes en la forma de las células se producen sobre todo por cambios en la orientación de los elementos del citoesqueleto dentro de las células. Uno de los mejores ejemplos de este fenómeno se ve en las etapas iniciales del desarrollo del sistema nervioso.

Hacia el final de la gastrulación en los vertebrados, las células externas (ectodérmicas) situadas a lo largo de la superficie dorsal del embrión se alargan y forman una capa epitelial alta llamada *placa neural* (fig. 9-77*a, b*). Las células de la placa neural se alargan cuando los microtúbulos se orientan con sus ejes longitudinales en paralelo al eje de la célula (recuadro, fig. 9-77*b*). Tras la elongación, las células del epitelio neural se constriñen en un extremo, lo que hace que las células adquieran forma de cuña y toda la capa celular se curve hacia adentro (fig. 9-77*c*). Este último cambio en la forma celular se debe a la contracción de una banda de microfilamentos que se ensamblan en la región cortical de la célula, justo debajo de la membrana celular apical (recuadro, fig. 9-77*c*). Por último la curvatura del tubo neural ocasiona que los bordes externos se toquen uno al otro, con lo que se forma un tubo cilíndrico y hueco (fig. 9-77*d, e*) que da origen a todo el sistema nervioso del animal.

REVISIÓN

1. Liste los diversos tipos de proteínas de unión con actina y una función de cada tipo.
2. Describa los pasos que da una célula de mamífero que se arrastra sobre un sustrato.
3. Describa la función de los filamentos de actina en las actividades del cono de crecimiento de una neurona.

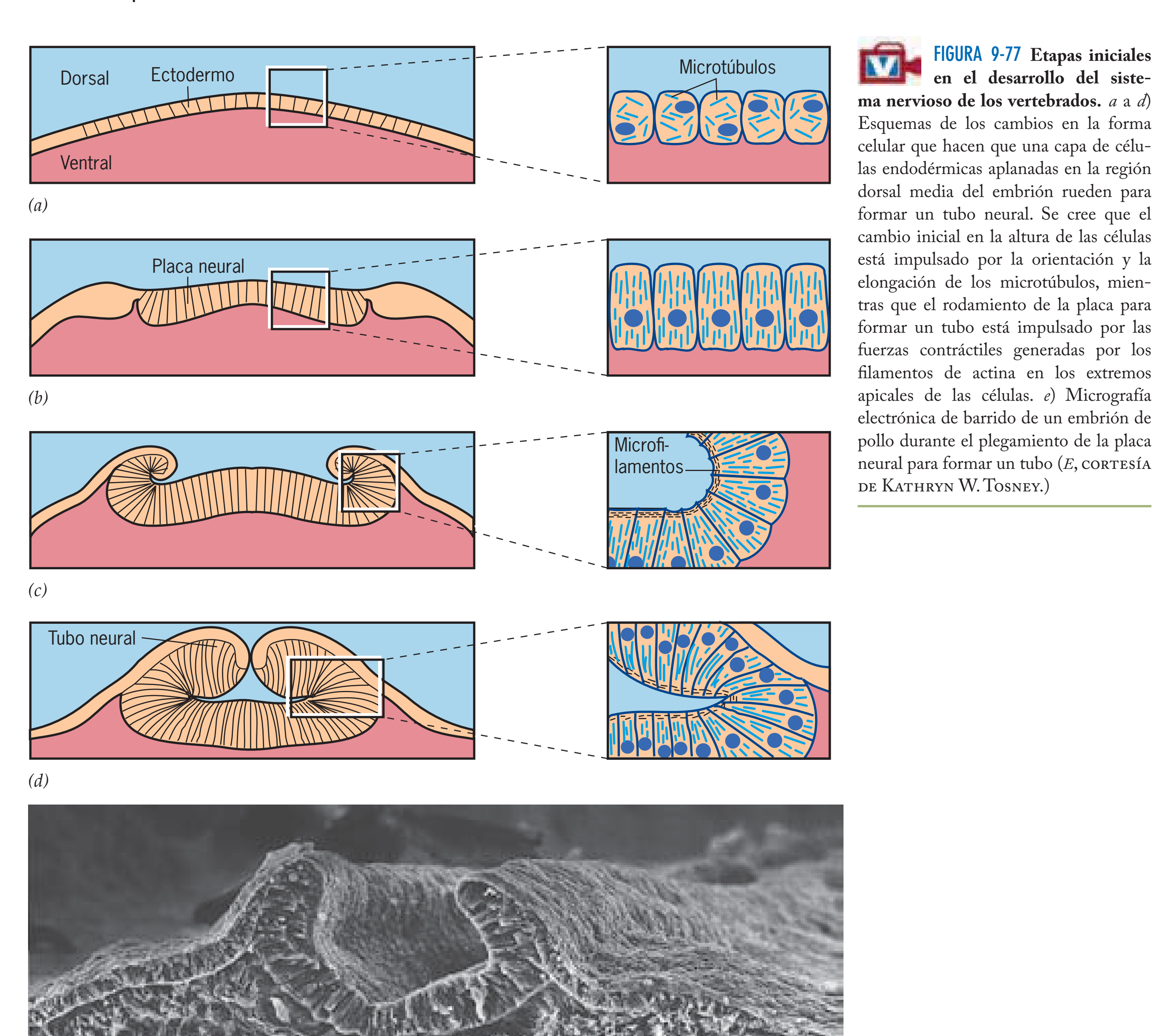


FIGURA 9-77 Etapas iniciales en el desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados. *a* a *d*) Esquemas de los cambios en la forma celular que hacen que una capa de células endodérmicas aplanadas en la región dorsal media del embrión rueden para formar un tubo neural. Se cree que el cambio inicial en la altura de las células está impulsado por la orientación y la elongación de los microtúbulos, mientras que el rodamiento de la placa para formar un tubo está impulsado por las fuerzas contráctiles generadas por los filamentos de actina en los extremos apicales de las células. *e*) Micrografía electrónica de barrido de un embrión de pollo durante el plegamiento de la placa neural para formar un tubo (*E*, CORTESÍA DE KATHRYN W. TOSNEY.)

SINOPSIS

El citoesqueleto se compone de tres tipos distintos de estructuras fibrosas: microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos (filamentos de actina), que participan en varias actividades celulares. Los elementos del citoesqueleto funcionan en conjunto como un soporte estructural que ayuda a mantener la forma de la célula; como una red interna encargada de colocar los diversos organelos en el interior celular, como parte de la maquinaria necesaria para el movimiento de materiales y organelos dentro de las células, y como elementos generadores de fuerza encargados del movimiento celular de un sitio a otro (pág. 328).

Los microtúbulos son estructuras tubulares huecas de 25 nm de diámetro que se ensamblan de la proteína tubulina y, además del citoesqueleto, forman parte del huso mitótico, los centriolos y el centro de los cilios y los flagelos. Los microtúbulos son polímeros ensamblados con heterodímeros alfa-beta de tubulina que se disponen en hileras, o protofilamentos. Muchas de las propiedades de los microtúbulos, inclusive su flexibilidad, estabilidad y capacidades para interactuar, dependen de los miembros de un grupo de proteínas relacionadas con los microtúbulos (MAP). A causa de su rigidez, a menudo los microtúbulos tienen una capacidad de soporte similar a la forma en que las vigas de acero

soportan un edificio alto. La función estructural de los microtúbulos es más evidente cuando se examinan procesos muy alargados, como los axopodios y los axones, que están llenos de microtúbulos orientados en paralelo al eje longitudinal del proceso. Los microtúbulos también participan en actividades tan diversas como el depósito de celulosa en la pared de una célula vegetal; el mantenimiento de la posición de los organelos membranosos de la vía biosintética, inclusive el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico, y en el movimiento de vesículas y otros materiales entre el cuerpo celular y las terminaciones axónicas de la célula nerviosa (pág. 333).

Tres familias de proteínas motoras están identificadas y caracterizadas: cinesinas y dineínas, que se mueven a lo largo de los microtúbulos, y miosinas, que se mueven a lo largo de los microfilamentos. Las proteínas motoras son capaces de convertir la energía química almacenada en el ATP en energía mecánica que se emplea para mover cargamentos celulares unidos al motor. Las fuerzas se generan cuando los cambios en la conformación de la proteína motora se vinculan con un ciclo químico que implica la unión y la hidrólisis de nucleótidos, y la liberación de los productos unidos (pág. 338).

En la mayoría de los casos, las cinesinas y la dineína citoplásmica mueven materiales a lo largo de microtúbulos en sentidos opuestos. Tanto la cinesina como las dineínas citoplásmicas son grandes proteínas motoras con cabezas globulares que interactúan con los microtúbulos y funcionan como máquinas generadoras de fuerza, y un sitio contrario a la cabeza que se une con los tipos específicos de cargamento que se transporta. La cinesina mueve materiales hacia el extremo más de un microtúbulo, la dineína citoplásmica lo hace hacia el extremo menos. La cinesina participa en el movimiento de las vesículas derivadas del retículo endoplásmico, los endosomas, los lisosomas y los gránulos secretores, y se demostró que es la principal proteína motora que media el transporte anterógrado en un axón (del cuerpo celular al final del axón) (pág. 339).

La nucleación in vivo de los microtúbulos se produce en diversos centros de organización de microtúbulos (MTOC). En las células animales, los microtúbulos del citoesqueleto casi siempre se forman en el centrosoma, una estructura compleja que contiene dos centriolos con forma de barril rodeados por material pericentriolar electrodenso y amorfo. Los centriolos contienen nueve fibrillas espaciadas de manera uniforme, cada una de las cuales se forma con tres microtúbulos y por lo general en pares, cuyos integrantes están orientados en ángulo recto uno con respecto al otro. Los microtúbulos suelen dispersarse desde el material pericentriolar, que contiene los componentes necesarios para la nucleación de los microtúbulos. Los microtúbulos que forman las fibras de un cilio o flagelo se originan del cuerpo basal, que en esencia tiene la misma estructura que el centriolo. Los centrosomas, los cuerpos basales y otros MTOC, como la superficie externa de la envoltura nuclear de las células vegetales, comparten un componente proteico, la tubulina gamma, que desempeña una función clave en la nucleación de los microtúbulos (pág. 342).

Los microtúbulos del citoesqueleto son polímeros dinámicos que se someten a acortamiento, elongación, desensamble y nuevo ensamble. El desensamble del citoesqueleto microtubular puede inducirse con varios agentes, como colquicina, frío y concentraciones elevadas de Ca^{2+}. Por lo general los microtúbulos del citoesqueleto se desensamblan antes de la división celular y las subunidades de tubulina se reensamblan como parte del huso mitótico. Este proceso de desensamble y reensamble se revierte después de la división. En cualquier momento específico, algunos microtúbulos del citoesqueleto aumentan de longitud mientras que otros se encogen. Cuando los microtúbulos individuales se siguen en el tiempo, se observa que van y vienen por fases de crecimiento y acortamiento, un fenómeno que se conoce como inestabilidad dinámica. Tanto el crecimiento como el encogimiento ocurren sobre todo, si no es que de manera exclusiva, en el extremo más del polímero, el extremo opuesto al MTOC. Los dímeros de tubulina polimerizados en un microtúbulo contienen una molécula de GTP que se hidroliza poco después de su incorporación al polímero. Durante los periodos de polimerización rápida, la hidrólisis del GTP unido a los dímeros de tubulina incorporados se retrasa hasta después de la incorporación de nuevos dímeros, de modo que el extremo del microtúbulo contiene una tapa de dímeros tubulina-GTP que favorece la adición de más subunidades y el crecimiento del microtúbulo. La concentración de Ca^{2+} y la presencia de MAP específicas también pueden regular el ensamble y el desensamble (pág. 345).

Los cilios y flagelos contienen una estructura central, el axonema, que se compone de un conjunto de microtúbulos que sostienen el organelo que sobresale de la superficie celular y provee la maquinaria para generar las fuerzas para la locomoción. El corte transversal permite ver que un axonema consiste en nueve parejas externas de microtúbulos (un microtúbulo A completo y un microtúbulo B incompleto) que rodean a un par de microtúbulos individuales. Un par de brazos se proyecta del microtúbulo A de cada pareja. Los brazos están formados por dineína ciliar, una proteína motora encargada de usar la energía que libera la hidrólisis del ATP para generar la fuerza necesaria para el batir de los cilios y los flagelos. Esto se logra cuando los brazos de dineína de una pareja se unen con el microtúbulo B de la pareja vecina y luego presentan un cambio de conformación que ocasiona el deslizamiento del microtúbulo A, hasta una distancia perceptible. El deslizamiento en un lado del axonema se alterna con el deslizamiento del otro lado, de manera que parte de cilio o flagelo se dobla primero en una dirección y luego en la contraria. El deslizamiento de los microtúbulos ya se demostró en forma directa mediante la unión de cuentas a las parejas de axonemas sin membrana para seguir sus movimientos relativos durante la reactivación (pág. 349).

Los filamentos intermedios (IF) son estructuras citoesqueléticas parecidas a cuerdas de unos 10 nm de diámetro que, según el tipo celular, pueden formarse por varias subunidades proteicas distintas capaces de ensamblarse en tipos similares de filamentos. A diferencia de los microtúbulos, los filamentos intermedios están formados por bloques de construcción asimétricos (subunidades tetraméricas) que se ordenan en filamentos que carecen de polaridad. Los IF resisten las fuerzas de tensión y son hasta cierto punto insolubles; aun así, como los otros dos tipos de elementos citoesqueléticos, son estructuras dinámicas que incorporan con rapidez las subunidades con marcas fluorescentes que se inyectan en la célula. Se cree que el ensamble y el desensamble están controlados sobre todo por la fosforilación y la desfosforilación. Parece que los IF proporcionan estabilidad mecánica a las células y son necesarios para algunas funciones especializadas de tejidos particulares (pág. 357).

Los filamentos de actina (o microfilamentos) tienen 8 nm de diámetro, están formados por un polímero helicoidal doble de la proteína actina y tienen una función primordial en todos los tipos de contractilidad y motilidad celular. Según el tipo de célula y su actividad, los filamentos de actina pueden organizarse en conjuntos muy ordenados, en redes laxas y poco definidas o en paquetes muy ajustados. A menudo los filamentos de actina se identifican por su capacidad para unirse con el fragmento S1 de miosina, que también revela la polaridad del filamento. Aunque ambos extremos de un filamento de actina pueden ganar o perder subunidades, el extremo barbado (o más) del filamento es el sitio preferido para la adición de subunidades, y el extremo afilado (o menos) es el sitio preferencial para la pérdida de las mismas. Para incorporarse en el extremo creciente de un filamento, una subunidad de actina debe estar unida con un ATP, que se hidroliza poco después de su incorporación. Las células mantienen un equilibrio dinámico entre las formas monoméricas y poliméricas de la actina, el cual puede alterarse por cambios en diversas condiciones locales. La participación de los filamentos de actina en un proceso particular es más fácil de probar si las células se tratan con citocalasina, que fomenta la despolimerización del filamento, o con faloidina, que impide el desensamble y la participación en actividades dinámicas (pág. 360).

Las fuerzas que se encargan de los procesos dependientes de microfilamentos pueden generarse mediante el ensamble del filamento de actina o, más a menudo, como resultado de la interacción con la proteína motora miosina. La propulsión de ciertas bacterias por el citoplasma de un fagocito infectado es un proceso impulsado por la polimerización de la actina. Las miosinas casi siempre se dividen en dos clases: las miosinas convencionales (tipo II) y las no convencionales (tipos I y III a XVIII). La miosina II es el motor molecular que genera la fuerza en varios tipos de tejidos musculares y también diversas actividades extramusculares, inclusive la citocinesis. Las moléculas de miosina II contienen una larga cola cilíndrica unida a una de las dos cabezas globulares. Las cabezas se unen al filamento de actina, hidrolizan el ATP y experimentan los cambios de conformación necesarios para generar la fuerza. Se cree que el cuello actúa como brazo de palanca que amplifica los cambios en la conformación de la cabeza. La cola fibrosa media el ensamble de la miosina en los filamentos bipolares. La mayoría de las miosinas no convencionales tiene una sola cabeza y dominios de cola variables; se cree que participan en la motilidad celular y el transporte de organelos (pág. 363).

La contracción de una fibra de músculo esquelético se debe al deslizamiento de filamentos delgados de actina al centro de las sarcómeras individuales de una miofibrilla y está impulsada por las fuerzas generadas en los puentes cruzados de la miosina que se extienden a partir de los filamentos gruesos. Los cambios que ocurren durante el acortamiento de una fibra muscular se reflejan en los cambios en el patrón de bandas de las sarcómeras, ya que las líneas Z de las orillas de la sarcómera se mueven hacia los bordes externos de las bandas A. La contracción se inicia cuando un impulso penetra al interior de la fibra muscular junto con los túbulos transversos membranosos, lo que estimula la liberación de Ca^{2+} de los sitios de almacenamiento en el retículo sarcoplásmico (SR). La unión de iones de calcio con las moléculas de troponina de los filamentos delgados produce un cambio en la conformación que mueve las moléculas de tropomiosina a una posición que expone los sitios para unión con miosina que las subunidades de actina del filamento delgado tienen. La interacción posterior entre la miosina y la actina inicia el deslizamiento del filamento (pág. 368).

La movilidad y la contractilidad extramusculares dependen de alguna de las proteínas que se encuentran en las células musculares, pero se disponen en configuraciones menos ordenadas, más lábiles y transitorias. La movilidad extramuscular depende de la actina, casi siempre junto con la miosina. La organización y el comportamiento de los filamentos de actina dependen de diversas proteínas de unión con la actina que afectan el ensamble de los filamentos de actina, sus propiedades físicas y las interacciones entre sí y con otros organelos celulares. La lista incluye proteínas que secuestran monómeros de actina e impiden la polimerización; proteínas que forman una tapa en el extremo del filamento de una actina, lo que bloquea el crecimiento del filamento o causa el desensamble del filamento; proteínas que forman enlaces cruzados en los filamentos de actina para formar paquetes, redes laxas o gelatinas tridimensionales; proteínas que cortan los filamentos de actina, y proteínas que unen los filamentos de actina con la superficie interna de la membrana plasmática (pág. 374).

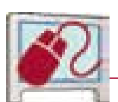
Los ejemplos de movilidad y contractilidad extramuscular comprenden el arrastramiento de las células sobre un sustrato y el crecimiento axónico. Por lo general el arrastramiento celular se efectúa mediante una proyección aplanada, similar a un velo, llamada lamelipodio, que se forma en el borde de avance de la célula. Cuando el lamelipodio sobresale de la célula, se adhiere al sustrato subyacente en puntos específicos y esto brinda sitios de anclaje temporal para que la célula se arrastre sobre ellos. La protrusión del lamelipodio se acompaña de nucleación y polimerización de los filamentos de actina y su relación con varios tipos de proteínas de unión con la actina. Las fuerzas necesarias para la protrusión del lamelipodio provienen de la polimerización de la actina. La punta del axón en crecimiento consiste en un cono de crecimiento, que se parece a un fibroblasto móvil reptante; contiene varios tipos de procesos locomotores, como un lamelipodio, microespigas y filópodos. El cono de crecimiento explora el ambiente y alarga el axón por el trayecto apropiado (pág. 377).

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. Si se tirara de una miofibrilla de manera que la longitud de las sarcómeras aumentara casi 50%, ¿qué efecto se esperaría que esto tuviera en la capacidad contráctil de la miofibrilla? ¿Por qué? ¿Qué efectos ejercería sobre las bandas H, A e I?
2. ¿Cuáles son las tres sustancias radiactivas diferentes que se inyectarían en una célula para marcar los microtúbulos de una célula sin marcar los demás elementos del citoesqueleto?
3. ¿Cuáles son los dos tipos de movilidad extramuscular que permanecerían intactos por los anticuerpos contra la miosina I y la miosina II? ¿Por qué?
4. Un centriolo contiene ______________ microtúbulos completos, y un cilio contiene _____________ microtúbulos completos.
5. Los microtúbulos pueden formarse in vitro a partir de tubulina unida con análogos de GTP que (a diferencia del GTP) no pueden hidrolizarse. ¿Qué propiedades se esperaría que tuvieran estos microtúbulos?
6. Listar dos cosas que cambiarían el equilibrio dinámico de una preparación in vitro de tubulina y microtúbulos hacia la formación de microtúbulos. Mencionar dos tratamientos que modificarían el equilibrio en la dirección contraria.
7. Se mencionó que el axonema ciliar o flagelar sin membrana es capaz de moverse con frecuencia y patrón normales. ¿Puede concluirse que la membrana plasmática no es importante para la función ciliar o flagelar?
8. Como se ve que las vesículas citoplásmicas se mueven en ambos sentidos dentro de un axón, ¿puede concluirse que algunos microtúbulos están orientados con sus extremos más hacia la terminación del axón y otros se orientan con la polaridad contraria? ¿Por qué sí o por qué no?
9. ¿Habría acuerdo en cuanto a la declaración de que el centrosoma desempeña una función crucial para establecer el ritmo de alargamiento y acortamiento de los microtúbulos de una célula animal? ¿Por qué sí o por qué no?
10. Si se comparara la estructura molecular de la cinesina y la miosina, que se cree evolucionaron de una proteína ancestral común, ¿qué partes (cabezas o colas) se esperaría que tuvieran más similitud entre ellas? ¿Por qué?
11. La figura 9-30*a* muestra la apariencia del corte transversal de un axonema ciliar cortado en la parte inferior del cilio. ¿Qué diferencias tendría la imagen de un corte transversal si se hubiera hecho muy cerca de la punta de un cilio al principio del movimiento de recuperación?
12. Si una molécula individual de cinesina puede moverse a una velocidad de 800 nm/seg en una prueba de motilidad in vitro, ¿cuál es

el ritmo máximo de recambio (moléculas de ATP hidrolizadas por segundo) mediante uno de los dominios motores de la molécula?

13. ¿Por qué supone que puede aprenderse más respecto a la dinámica de los microtúbulos con la inyección de tubulina fluorescente en una célula que con tubulina con marca radiactiva? ¿Se podría pensar en una pregunta que se respondiera mejor con la tubulina con marca radiactiva?
14. Supóngase que se descubrió que un ratón que carece de copias del gen para cinesina convencional no parece mostrar efectos adversos y vive hasta la vejez. ¿Qué se concluiría acerca de la función de la cinesina en la locomoción intracelular?
15. ¿Qué tipo de tejido de vertebrados se esperaría que fuera una excelente fuente de tubulina?, ¿y de actina?, ¿y de queratina? ¿Qué proteína cabría esperar que fuera la menos soluble y la más difícil de extraer? ¿Qué tipos de proteína se esperaría encontrar como contaminantes en una preparación de tubulina?, ¿cuáles en una preparación de actina?
16. La actina es una de las proteínas mejor conservadas durante la evolución. ¿Qué significa esto respecto a la estructura y la función de esta proteína en las células eucariotas?
17. De acuerdo con los datos de secuencias genómicas, la dineína citoplásmica está ausente en algunas plantas (p. ej., *Arabidopsis*) y sí se encuentra en otras (p. ej., arroz). ¿Sorprende este hallazgo? ¿Qué más podría hacerse para confirmar o rechazar esta declaración? ¿Cómo es posible que las células de plantas superiores operen sin dineína citoplásmica?
18. La acción de la miosina (fig. 9-61) difiere de la función de la cinesina (fig. 9-15) en que una de las cabezas de cinesina siempre está en contacto con un microtúbulo, mientras que ambas cabezas de la miosina se desprenden por completo del filamento de actina. ¿De qué forma se relacionan estas diferencias con los dos tipos de actividades motoras en las que participan estas proteínas?
19. Se cree que los núcleos de los microtúbulos de un axón se forman en el centrosoma, luego se cortan de su sitio de nucleación y se mueven hacia el axón. En el texto se mencionó que la dineína citoplásmica es la encargada del movimiento retrógrado de organelos en los axones, aunque también se piensa que este mismo motor media el movimiento anterógrado de los microtúbulos en estos mismos procesos celulares. ¿Cómo es posible que el mismo motor dirigido hacia el extremo menos participe en los movimientos en ambos sentidos?
20. Las proteínas motoras a menudo se describen como mecanoenzimas. ¿Por qué? ¿Podría aplicarse este mismo término virtualmente a todas las enzimas? ¿Por qué sí o por qué no?



SITIO EN INTERNET www.wiley.com/college/karp

Las animaciones y los videos indicados en este capítulo pueden visitarse en el sitio de Cell and Molecular Biology de Karp en Internet. También hallará todas las respuestas a las preguntas analíticas recién planteadas, autoexámenes que le ayudarán a prepararse para los exámenes, y vínculos con fascinantes recursos. La sección lecturas adicionales que sigue se amplía en el sitio en Internet.

LECTURAS ADICIONALES

Badano, J. L., et al. 2005. The centrosome in human genetic disease. *Nature Revs. Gen.* 6:194–205.

Akhmanova, A. & Hoogenraad, C. C. 2005. Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:47–54.

Asbury, C. L. 2005. Kinesin: world's tiniest biped. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:89–97.

Burgess, S. A. & Knight, P. J. 2004, Is the dynein motor a winch? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14:138–146.

Chang, L. & Goldman, R. D. 2004. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 5:601–613.

Cyr, R. 2005. How and Y plant microtubules branch. *Nature Cell Biol.* 7:927–929.

Eley, L., et al. 2005. Cilia and disease. *Curr. Opin. Gen. Develop.* 15:308–314.

Geeves, M. A. & Holmes, K. C. 2005. The molecular mechanism of muscle contraction. *Adv. Prot. Chem.* 71:161–193.

Gitai, Z. 2005. The new bacterial cell biology: moving parts and subcellular architecture. *Cell* 120:577–586.

Goley, E. D. & Welch, M. D. 2006. The ARP 2/3 complex. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 7:713–726.

Herrmann, H. & Aebi, U. 2004. Intermediate filaments. *Annu. Rev. Biochem.* 73:749–780.

Hirokawa, N., et al. 2006. Nodal flow and the generation of left-right asymmetry. *Cell* 125:33–45.

Hollenbeck, P. J. & Saxton, W. M. 2005. The axonal transport of mitochondria. *J. Cell Sci.* 118:5411–5419.

Hyman, A. A. & Howard, J., eds. 2005. Reviews on cytoskeleton and motor proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:#1.

Koonce, M. P. & Samsó, M. 2004. Of rings and levers: the dynein motor comes of age. *Trends Cell Biol.* 14:612–619.

Mallik, R. & Gross, S. P. 2004. Molecular motors: strategies to get along. *Curr. Biol.* 14:R971–R982.

Moller-Jemsen, J. & Löwe, J. 2005. Increasing complexity of the bacterial cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:75–81.

Nicholson-Dykstra, S., et al. 2005. Actin dynamics: growth from dendritic branches. *Curr. Biol.* 15:R346–R357.

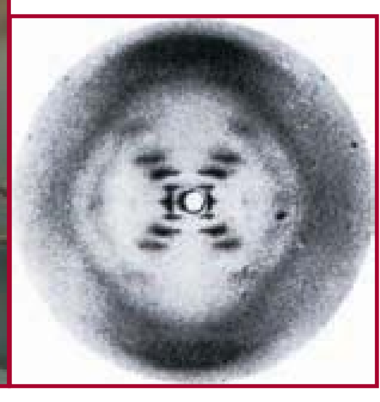
Singla, V. & Reiter, J. F. 2006. The primary cilium as the cell's antenna. *Science* 313:629–633.

Small, J. V. & Resch, G. P. 2005. The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:517–523.

Small, J. V. & Glotzer, M., eds. 2006. Reviews on cytoskeleton and motor proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:#1.

Toivola, D. M., et al. 2005. Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. *Trends Cell Biol.* 15:608–617.

CAPÍTULO



Naturaleza del gen y el genoma

El concepto de gen ha sufrido una notable evolución a medida que los biólogos han aprendido más acerca de la naturaleza de la herencia. Los estudios iniciales revelaron que los genes son factores retenidos a través de la vida de un organismo que pasan a su progenie. Después de estos hallazgos se puso en evidencia, en la siguiente mitad de siglo pasado, que estos factores hereditarios residían en los cromosomas y estaban formados por el DNA (ácido desoxirribonucleico), una macromolécula con propiedades extraordinarias. En la figura 10-1 se presenta un panorama amplio de algunos de los primeros acontecimientos fundamentales a lo largo de este singular viaje de descubrimientos, coronado por la descripción de la estructura helicoidal doble del DNA en 1953. En los decenios que siguieron a este punto de inflexión, una rama importante de la biología molecular comenzó a concentrarse en el **genoma**, que es el cuerpo colectivo de información genética presente en una especie. Un genoma contiene todos los genes necesarios para "construir" un organismo específico. Durante la última década poco más o menos, la colaboración de muchos laboratorios en todo el mundo ha permitido descubrir las secuencias completas de nucleótidos de muchos genomas distintos, incluido el de nuestra propia especie y el del chimpancé, nuestro pariente vivo más cercano. Por primera vez en la historia del ser humano, disponemos de los medios para reconstruir la trayectoria genética de la evolución humana comparando regiones correspondientes del genoma de organismos afines. Es posible descubrir cuáles regiones de nuestro genoma han sido duplicadas y cuáles se han perdido desde que nos separamos a partir de un ancestro común; puede observarse cuáles nucleótidos de un gen o de una

Modelo del DNA que elaboraron James Watson y Francis Crick de la Cambridge University *en 1953. El recuadro muestra la foto tomada por Rosalind Franklin del patrón de difracción de rayos X de una fibra de DNA que sugería la estructura helicoidal del DNA.* (CORTESÍA DE SCIENCE & SOCIETY PICTURE LIBRARY, SCIENCE MUSEUM, LONDON; RECUADRO: REIMPRESO CON AUTORIZACIÓN DE R. E. FRANKLIN Y R. G. GOSLING, NATURE 171:740, 1953. © 1953 POR MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)

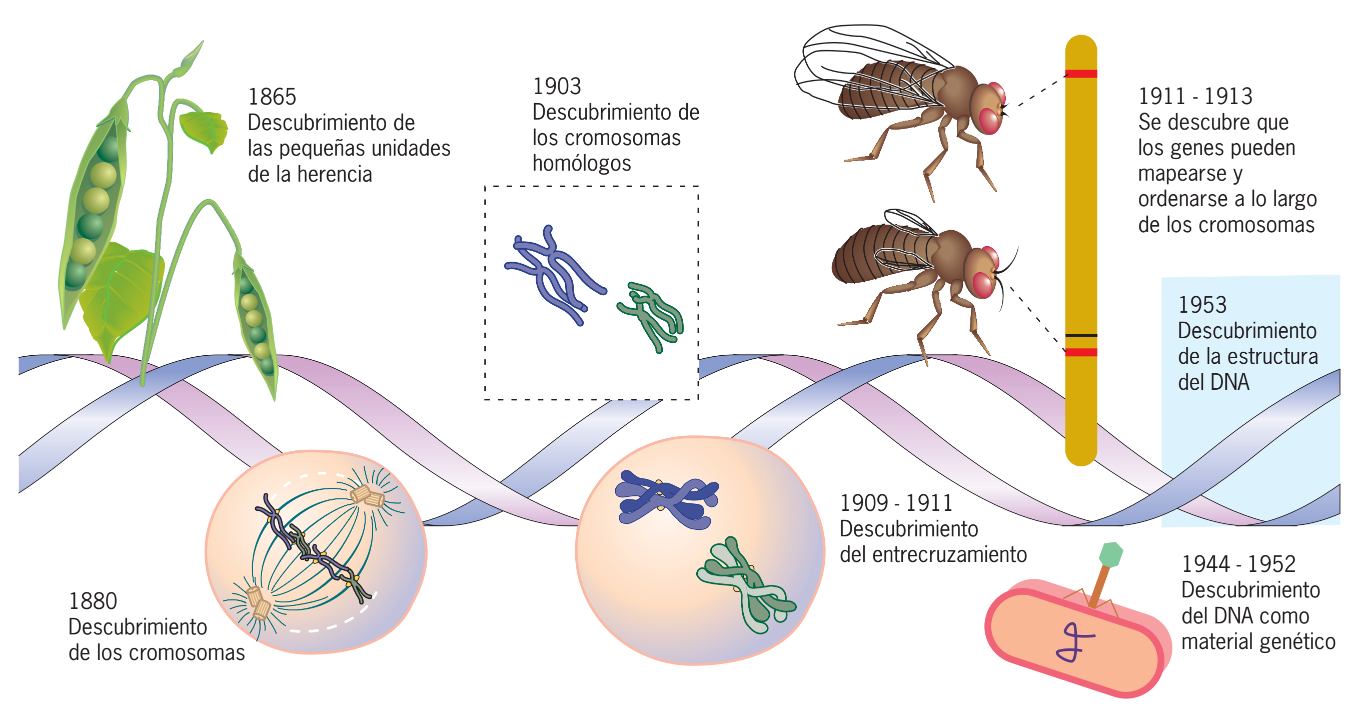


FIGURA 10-1 Sinopsis de los descubrimientos más importantes de la naturaleza del gen. Cada uno se analiza en este capítulo.

región reguladora específicos han sufrido cambio y cuáles han permanecido constantes; y lo que es más importante, es posible inferir cuáles partes de nuestro genoma se han visto sujetas a la selección natural y cuáles han tenido libertad de derivar al azar en el transcurso del tiempo. También ha comenzado a utilizarse esta información para descubrir más acerca de nuestra historia como especie: cuándo y de dónde surgimos, cómo nos relacionamos unos con otros, y cómo llegamos a ocupar las regiones de la Tierra que habitamos.

10.1 EL CONCEPTO DE GEN COMO UNIDAD DE LA HERENCIA

Como ciencia, la genética apareció alrededor del año 1860 con el trabajo de Gregor Mendel, un fraile del monasterio de St. Thomas localizado hoy en día en la República Checa. El laboratorio de Mendel fue un pequeño jardín plantado en el huerto del monasterio. No se conoce con exactitud qué llevó a Mendel a comenzar sus estudios, pero desde luego tenía un claro plan experimental en mente: su objetivo fue casar o *cruzar* plantas de guisante (chícharos) con diferentes características hereditarias y determinar el patrón por medio del cual estas propiedades se transmitían a la descendencia. Mendel seleccionó al guisante de jardín por diferentes razones prácticas, sobre todo porque podía obtener una gran variedad de semillas que germinarían plantas con rasgos distintos. Mendel decidió enfocarse en siete caracteres o rasgos muy definibles, como la altura de la planta y el color de sus flores, estos últimos aparecidos en dos formas alternativas reconocibles con claridad (cuadro 10-1). Después de varios años de cuidadosos estudios, durante los cuales cultivó y cruzó sus plantas durante varias generaciones y contó el número de individuos que mostraban diferentes características, Mendel llegó a las siguientes conclusiones, que se describen con la terminología genética actual:

1. Las características de las plantas dependían de factores (o unidades) de herencia, que más tarde llamó **genes**. Cada planta poseía dos copias del gen que controla el desarrollo de cada rasgo, una derivada de cada progenitor. Los dos genes podían ser idénticos o no. De manera posterior, estas dos formas alternativas de genes se conocieron como **alelos**. Para cada uno de los siete rasgos estudiados uno de los dos alelos dominaba sobre el otro. Si ambos aparecían juntos en la misma planta, el alelo dominante enmascaraba la existencia del recesivo.
2. Cada célula germinativa (o *gameto*) generada por una planta sólo tenía una copia del gen correspondiente a cada carac-

Cuadro 10-1 Las siete características de los guisantes de Mendel

Característica	Alelo dominante	Alelo recesivo
Altura de la planta	Alta	Baja
Color de la semilla	Amarilla	Verde
Forma de la semilla	Redonda	Angular (rugosa)
Color de las flores	Púrpura	Blanco
Posición de las flores	A lo largo del tallo	En los extremos del tallo
Color de la vaina	Verde	Amarillo
Forma de la vaina	Llena	Arrugada

terística. Un gameto en particular podía contener el alelo recesivo o el dominante para cada uno de los rasgos determinantes, pero no los dos alelos. Cada planta se origina por la unión de un gameto masculino con uno femenino. Por consiguiente, de los alelos que determinan cada rasgo en una planta, uno se hereda del progenitor femenino y el otro del masculino.

3. En cada planta los dos alelos que controlan un rasgo permanecen unidos durante toda la vida, pero se separan (o *segregan*) durante la formación de los gametos. Esta referencia es la base de la "ley de la segregación" de Mendel.
4. La separación de los dos alelos correspondientes de un rasgo no tiene efecto sobre la separación de los alelos de otro rasgo, es decir, que son independientes. Por ejemplo, un gameto específico puede recibir un gen paterno que controla el color de la semilla y un gen materno que controla la forma de dicha semilla. Este dato se basa en la "ley de la permutación independiente" de Mendel.

Mendel presentó los resultados de su trabajo de investigación a los miembros de la Sociedad de Historia Natural de Brünn, Austria; las actas de sus sesiones no registran comentario alguno de esta presentación. Mendel publicó sus experimentos en la revista de dicha entidad en 1866, pero no suscitaron ningún interés sino hasta el año 1900, 16 años después de su muerte. En ese año, tres botánicos europeos llegaron a las mismas conclusiones de manera *independiente* y los tres descubrieron las publicaciones de Mendel olvidadas durante 35 años en los armarios de muchas bibliotecas de toda Europa.

10.2 CROMOSOMAS: PORTADORES FÍSICOS DE LOS GENES

Aunque Mendel suministró datos convincentes de que factores discretos, o genes, controlaban los rasgos hereditarios, en sus estudios no se preocupó en absoluto de la naturaleza física de estos elementos o su localización dentro del organismo. Mendel llevó a cabo su proyecto de investigación sin observación alguna bajo el microscopio. Durante el tiempo transcurrido entre el trabajo de Mendel y su descubrimiento, algunos biólogos se ocuparon de este aspecto de la herencia (las bases físicas de ésta dentro de la célula).

El descubrimiento de los cromosomas

Alrededor del año 1880, diferentes biólogos europeos observaban con atención la actividad de las estructuras celulares recién evidenciadas con los microscopios ópticos, que mejoraban con rapidez. Estos científicos no conocían el trabajo de Mendel, pero concluyeron que cualquier factor que gobernara las características heredadas debía pasar de una célula a la otra y de una generación a la siguiente. Esta inferencia, por sí misma, es fundamental; toda la información genética necesaria para generar y conservar una planta o animal complejo debe estar por completo dentro de una sola célula. Las observaciones efectuadas sobre células en división que llevó a cabo el biólogo alemán Walther Flemming en los primeros años de la década de 1880 revelaron que los elementos del contenido citoplásmico permanecen en una u otra célula hija al azar, lo que dependía sólo del plano a través del cual pasara el surco que divide a la célula. Por el contrario, había al parecer notoria tendencia a que el contenido del núcleo se dividiera por igual entre las dos células hijas. Durante la división celular, el material del núcleo se organizaba en "filamentos" visibles, que se denominaron **cromosomas**, término que significa "corpúsculos coloreados".

Por aquel tiempo se observó el proceso de fecundación y se describió el papel de los dos gametos (espermatozoide y óvulo) (fig. 10-2). Aunque el espermatozoide es una célula diminuta, se sabe que tiene igual importancia genética que el óvulo, de tamaño mucho mayor. ¿Qué tienen en común estas dos células tan diferentes? El núcleo y sus cromosomas son las características más distinguibles. La importancia de los cromosomas aportados por el elemento masculino se manifestó en el estudio que efectuó el biólogo alemán Theodore Boveri en huevos de erizo de mar, fecundados con dos espermatozoides en vez de uno, como sucede en condiciones normales. Esta situación, conocida como *poliespermia*, se caracteriza por alteración de la división celular y la muerte temprana del embrión. ¿Por qué la presencia de un núcleo adicional del espermatozoide tan pequeño dentro del ovocito mucho más grande tiene tan evidentes consecuencias? El segundo espermatozoide dona un grupo adicional de cromosomas y otro centriolo (pág. 342). Estos componentes redundantes propician una división celular anormal en el embrión durante la cual las células hijas reciben diferentes números de cromosomas. Boveri concluyó que el proceso ordenado del desarrollo normal es "dependiente de una combinación particular de cromosomas y esto sólo puede significar que los cromosomas individuales deben poseer diferentes cualidades". Esta fue la primera evidencia de una diferenciación *cualitativa* entre los cromosomas.

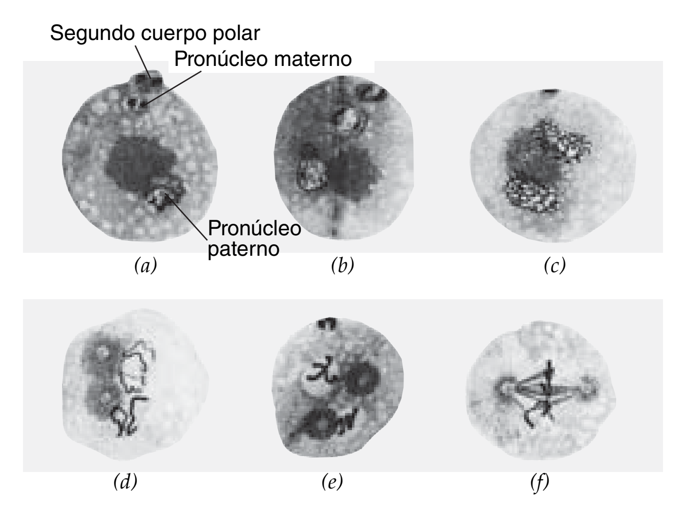


FIGURA 10-2 Sucesos que ocurren después de la fecundación del gusano redondo *Ascaris*, tal y como lo notificaron las investigaciones clásicas del siglo XIX. Los gametos masculino y femenino contienen dos cromosomas. La fusión del esperma y el núcleo del huevo (llamado pronúcleo) en el citoplasma del huevo (entre *e* y *f*) produce un cigoto que contiene cuatro cromosomas. El segundo cuerpo polar que se muestra en *a* es un producto de la meiosis previa, como se describe en la sección 14.3. (TOMADA DE T. BOVERI, JENAISCHE ZEIT 22:685, 1988.)

Los sucesos que tienen lugar después de la fecundación se observaron con más detalle en el gusano redondo *Ascaris* sp., cuyos escasos cromosomas son grandes y fáciles de observar, sea en el siglo XIX o ahora en los laboratorios para estudiantes de biología. En 1883, el biólogo belga Edouard van Beneden observó que las células del cuerpo del gusano poseían cuatro cromosomas grandes, pero los núcleos masculino y femenino presentes en el huevo justo después de la fecundación (antes de la fusión de los dos núcleos) sólo poseían dos cromosomas cada uno (fig. 10-2). Alrededor de esos años se describió el proceso de la meiosis y en 1887 el biólogo alemán August Weismann propuso que la meiosis incluía una "división reducida" durante la cual el número de cromosomas disminuía a la mitad después de la formación de los gametos. Si la división de reducción no ocurría, y cada gameto contenía el mismo número de cromosomas, como una célula adulta, entonces la unión de los dos gametos debería doblar el número de cromosomas en las células de la progenie. El número de cromosomas debería duplicarse con cada nueva generación, lo cual desde luego no puede suceder.[1]

Cromosomas como portadores de la información genética

El redescubrimiento del trabajo de Mendel y su confirmación tuvieron una inmediata influencia en la investigación de la biología celular. Cualquiera que fuera su naturaleza física, los portadores de las unidades de herencia tenían que correlacionarse de manera coherente con los principios mendelianos. En 1903, Walter Sutton, graduado de la *Columbia University*, publicó un artículo en el que destacó de manera directa a los cromosomas como portadores físicos de los factores genéticos de Mendel. Sutton observó la formación de células en el espermatozoide del saltamontes que, al igual que en el de *Ascaris* sp., tiene cromosomas grandes y de fácil observación. En las células germinales de la gónada masculina ocurren dos tipos de divisiones: la mitótica, mediante la cual las espermatogonias producen más espermatogonias, y la meiótica, durante la que la espermatogonia genera espermatozoides (véase fig. 14-41). Durante la observación de los estados de mitosis del espermatozoide del saltamontes, Sutton cuantificó 23 cromosomas. El examen minucioso de la forma y tamaño de los 23 cromosomas sugirió que se presentaban en pares "al parecer idénticos". Se distinguieron 11 pares de cromosomas junto con un cromosoma adicional, llamado *cromosoma accesorio* (con posterioridad se demostró que se trataba del cromosoma X determinante del sexo), que no tenía pareja o estaba solo. Sutton comprobó que la presencia de pares de cromosomas, o **cromosomas homólogos** como pronto se los denominó, se correlacionaba perfectamente con los pares de factores hereditarios descubiertos por Mendel.

Cuando Sutton examinó los cromosomas en las células, justo al inicio de la meiosis, encontró que los miembros de cada par de cromosomas se vinculaban uno con otro y formaban un complejo *bivalente*. Se reconocieron 11 estructuras bivalentes, cada una con una línea de relación transversa, en la que los dos

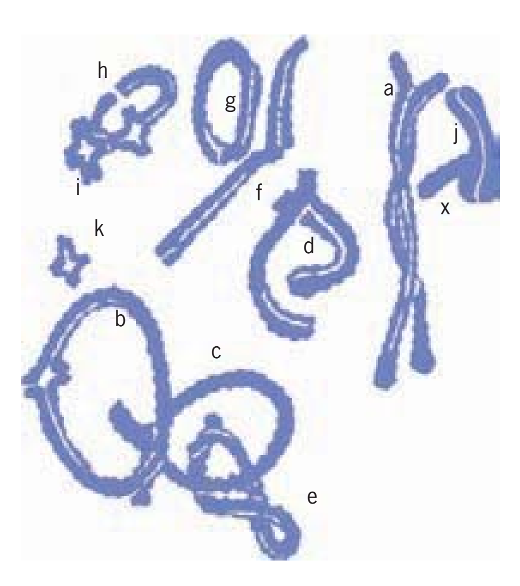


FIGURA 10-3 **Cromosomas homólogos.** Esquema de Sutton de los cromosomas homólogos del saltamontes macho, vinculados durante la profase meiótica para formar bivalentes. Se observan 11 pares de cromosomas homólogos (*a-k*) y un cromosoma *X* no pareado. (Tomada de W. S. Sutton, Biol. Bull. 4:24, 1902.)

cromosomas homólogos estaban unidos (fig. 10-3). La primera división meiótica aseguraba la separación de los dos cromosomas homólogos dentro de células diferenciadas. Esta fue la división de reducción que había propuesto 15 años antes Weismann en sus trabajos teóricos. De nueva cuenta, se trataba de la base física de la propuesta de Mendel acerca de la existencia de parejas de factores hereditarios que permanecen unidos durante toda la vida de un individuo, pero que se separan durante la formación de los gametos. La división de reducción observada por Sutton explicó algunos otros hallazgos de Mendel: los gametos sólo contienen una versión de cada gen (alelo); el número de alelos que posee cada gameto es igual al número de alelos con el gameto homólogo, y los dos gametos que se unen durante la fecundación producen un individuo con dos alelos para cada rasgo. Empero, aún persistían muchas interrogantes sin respuesta. Por ejemplo, ¿cómo se organizan los genes en los cromosomas? y ¿podría determinarse el sitio donde se localizan los genes específicos?

Los cromosomas como grupo de ligamiento Con la misma claridad que percibió la relación entre la función de los cromosomas y los resultados de Mendel en las plantas de guisantes, Sutton halló también un problema fascinante. Mendel observó la herencia de siete rasgos y encontró que cada uno se heredaba de forma independiente respecto de los otros. Esta fue la base de la ley de la permutación independiente de Mendel. Sin embargo, si los genes permanecían unidos dentro de los cromosomas, al igual que las cuentas de un rosario, entonces un progenitor debía pasar cromosomas enteros a su descendencia, esto es, con grupos de genes. Los genes en un mismo cromosoma debían actuar como si estuvieran *ligados* entre sí, es decir, formar parte de un mismo **grupo de ligamiento**.

[1] Para recordar algunas de las fases que ocurren durante la meiosis, el lector puede consultar la sección 14.3, que describe los pasos iniciales del ciclo de vida de un organismo eucariota.

¿De qué manera los siete rasgos de Mendel se permutaron de modo independiente?, ¿se encontraban todos sobre diferentes grupos unidos, esto es, diferentes cromosomas? Si ese fuera el caso, el guisante de jardín debía poseer siete pares diferentes de cromosomas homólogos. Los genes que controlan cada rasgo estudiado por Mendel pueden identificarse en cromosomas diferentes o estar separados en el mismo cromosoma y actuar de manera independiente (pág. 394). La predicción de Sutton acerca de grupos ligados pasó pronto de una mera conjetura a un hecho. En apenas dos años se demostró en los guisantes dulces que dos rasgos (color de las flores y forma del polen) estaban ligados y en poco tiempo se acumularon otros datos de la unión cromosómica.

Análisis genético en *Drosophila*

Con rapidez la investigación en genética se enfocó en un organismo particular, la mosca de la fruta, *Drosophila* sp. (fig. 10-4). Dicha mosca tiene un tiempo de generación (desde el huevo hasta un adulto sexualmente maduro) de unos 10 días y puede producir más de 1 000 huevecillos en todo el tiempo de vida de este organismo. Además de ser un animal muy pequeño, de modo que es posible manejar un gran número de estos insectos, es fácil de conservar y aumentar y su mantenimiento es muy barato. En 1909, Thomas Hunt Morgan, de la *Columbia University*, lo consideró el organismo perfecto e inició lo que después fue el principio de una nueva era en la investigación genética. Cuando comenzó a trabajar con este insecto tuvo una gran desventaja: sólo disponía de una "cepa" de la mosca, la de **tipo silvestre**. Mendel tuvo tan sólo que comparar algunas variedades de semillas de guisante, pero Morgan debió generar sus propias variedades de mosca de la fruta. Esperaba que pudieran surgir variantes del tipo silvestre si criaba moscas en suficiente cantidad. Antes de un año, después de criar miles de moscas, logró su primer **mutante**, es decir, un individuo con una característica hereditaria que lo diferenciaba del tipo silvestre. El mutante tenía ojos blancos en lugar de los ojos rojos habituales (fig. 10-4).

Para el año de 1915, Morgan y sus estudiantes habían encontrado 85 diferentes mutantes con una amplia variedad de estructuras afectadas. Al parecer, en algunas ocasiones muy raras ocurría un cambio espontáneo, o **mutación**, dentro de un gen, que se alteraba de manera permanente y podía transmitirse de una generación a la siguiente. Demostrar que una alteración espontánea en un gen se heredaba tuvo consecuencias mucho más trascendentes que la genética de *Drosophila* sp. Esto sugería un mecanismo para el origen de la variación que existe dentro de las poblaciones, lo cual fue una evidencia para una relación directa con la teoría de la evolución. Si las variantes de los genes podían aparecer de manera espontánea, entonces las poblaciones aisladas podrían ser diferentes en términos genéticos las unas de las otras y al final dar lugar a nuevas especies.

Las mutaciones son un suceso necesario para la evolución, pero también son una herramienta para los genetistas, un signo contra el cual se puede comparar el estado silvestre. Conforme se aislaron los mutantes de *Drosophila* sp., se criaron, cruzaron y mantuvieron en reserva en el laboratorio. Tal y como se esperaba, las 85 mutaciones no se permutaron de manera independiente; en lugar de ello, Morgan encontró que pertenecían a cuatro diferentes grupos ligados, uno con muy pocos genes mutantes (sólo dos en 1915). Este dato se relaciona de manera exacta con la observación de que las células de *Drosophila* sp. poseen cuatro pares de cromosomas homólogos, uno muy pequeño (fig. 10-5). Pocas dudas persistieron acerca de que los genes residían en los cromosomas.

Entrecruzamiento y recombinación

Aunque se confirmó la vinculación de genes entre grupos ligados, la relación entre alelos sobre el mismo cromosoma era *incompleta*. En otras palabras, alelos de dos genes diferentes, como los que codifican las alas cortas y el cuerpo oscuro (como en la figura 10-7), que estuvieron en principio presentes o se

FIGURA 10-4 La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Fotografía de una hembra silvestre y un macho con una mutación que produce ojos blancos. (Cortesía de Stanley J. P. Iyadurai.)

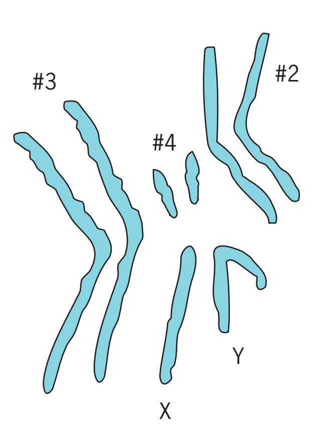


FIGURA 10-5 Las moscas de la fruta tienen cuatro pares de cromosomas homólogos, uno de los cuales es muy pequeño. Los dos cromosomas homólogos diferentes son los que determinan el sexo. Como los seres humanos, las moscas de la fruta macho son XY y las hembras XX.

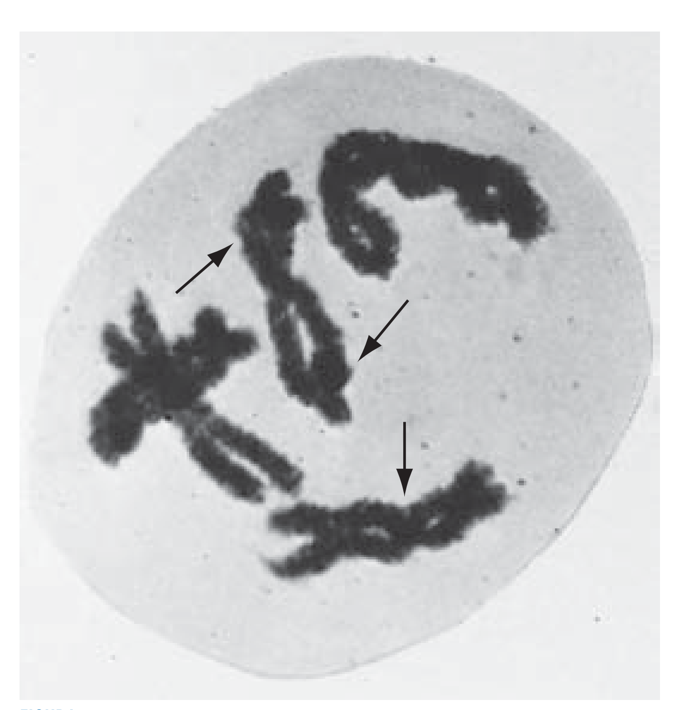
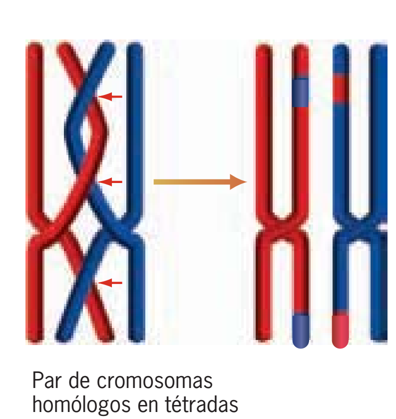


FIGURA 10-6 Visualización de los sitios de entrecruzamiento. Los cromosomas humanos se entrelazan durante la meiosis, como se observa en esta micrografía de las células meióticas de un lirio. Los puntos en los que se cruzan los homólogos se denominan *quiasmas* (flechas) y, como se analiza en el capítulo 14, son los sitios donde ocurre el entrecruzamiento en una etapa más temprana. (Cortesía de A. H. Sparrow.)

hallaban juntos en un cromosoma, no siempre permanecieron unidos durante la producción de gametos. Las características maternas y paternas heredadas por un individuo en cromosomas homólogos separados pueden remezclarse de modo que terminen en el mismo cromosoma de un gameto. Por el contrario, dos características que se heredaron juntas en el mismo cromosoma podían separarse la una de la otra y colocarse al final en gametos separados.

En 1911, Morgan formuló una explicación para la "rotura" del ligamento. Dos años antes, F. A. Janssens observó que cromosomas homólogos de los bivalentes se entrelazaban en la etapa temprana de la meiosis (fig. 10-6). Janssens había propuesto que esta interacción entre cromosomas maternos y paternos resultaba en la rotura e intercambio de piezas del cromosoma. Con base en esta proposición, Morgan sugirió que este fenómeno, que denominó **entrecruzamiento** (o **recombinación genética**), podría explicar la aparición de la descendencia (*recombinantes*) de modo tal que surgen combinaciones inesperadas de características genéticas. Un ejemplo de entrecruzamiento se muestra en la figura 10-7.

Análisis de la descendencia de un gran número de cruzas entre los adultos que portan una variedad de alelos en el mismo cromosoma indican que: a) el porcentaje de recombinaciones entre un par de genes en un cromosoma, como el color del ojo o la longitud de las alas, fue en esencia constante en un experimento y otro, y b) los porcentajes de recombinación entre diferentes pares de genes, por ejemplo entre el color de los ojos y la longitud de las alas en comparación con el color de los ojos y el color del cuerpo, podían ser muy diferentes.



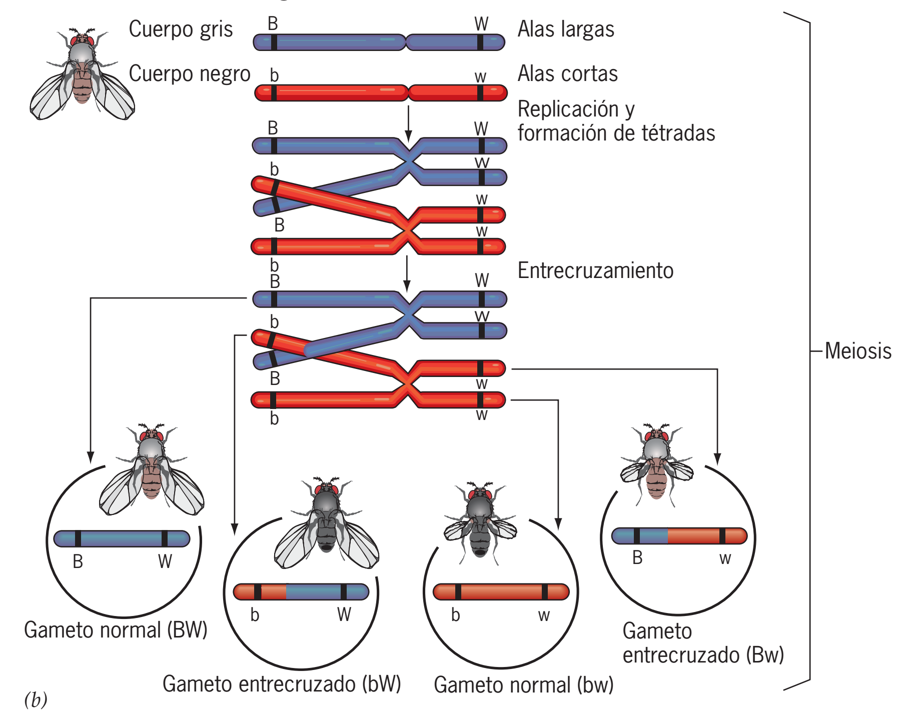


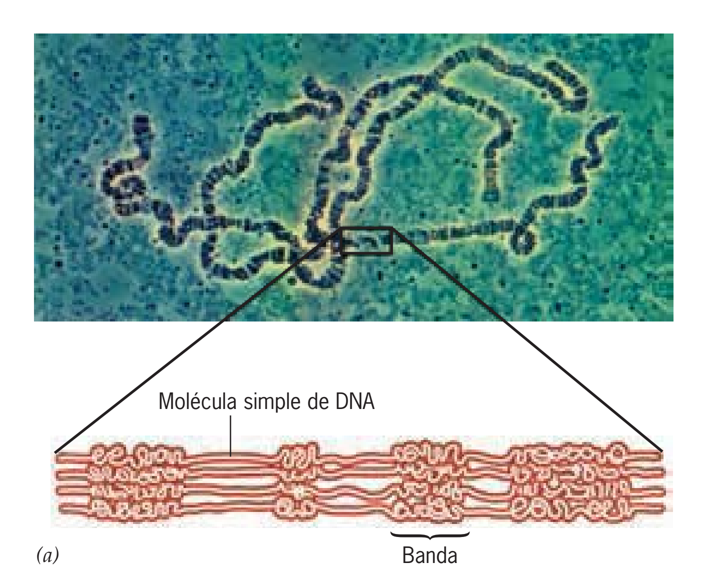
FIGURA 10-7 El entrecruzamiento proporciona el mecanismo para intercambiar los alelos de los cromosomas materno y paterno. *a*) Formación bivalente (tétrada) durante la meiosis que muestra las tres posibles intersecciones del entrecruzamiento (quiasmas, indicadas con flechas rojas). *b*) Representación simplificada de un entrecruzamiento sencillo en un heterocigoto de *Drosophila* (*BbWw*) en el cromosoma número 2 y los gametos resultantes. Si alguno de los gametos entrecruzados participa en la fecundación, la descendencia presenta un cromosoma con una combinación de alelos ausente en un solo cromosoma en las células de los progenitores.

El hecho de que un par de genes tenga la misma frecuencia de recombinación en cada cruza sugiere que la posición de los genes a lo largo del cromosoma (**loci**) se fijó y no varió de una mosca a la siguiente. Si se fija el locus de cada gen, entonces la frecuencia de recombinación entre dos genes provee una medida de la distancia que separa a estos dos genes. Cuanto mayor sea el espacio disponible entre dos sitios del cromosoma, más probable es que ocurra la rotura entre esos dos sitios y mayor la frecuencia de recombinación. En 1911, Alfred Sturtevant, un graduado de la *Columbia University*, trabajó en el laboratorio de Morgan, concibió la idea de que las frecuencias de recombinación podían utilizarse para mapear las posiciones relativas de los genes individuales a lo largo de un cromosoma específico. Un ejemplo de los principios que operan en este procedimiento de mapeo se ilustra en la figura 10-7. En este ejemplo, los genes de la longitud del ala y el color del cuerpo en *Drosophila* sp. están situados a una distancia considerable el uno del otro en el cromosoma y, por lo tanto, es probable que se encuentren separados por un punto de rotura y entrecruzamiento interpuesto. En cambio, los genes para el color de ojos y el color del cuerpo están muy cerca el uno del otro en el cromosoma, y en consecuencia es menos probable que se desliguen. A partir de las frecuencias de recombinación, Sturtevant (que llegó a ser uno de los genetistas más prominentes del siglo) comenzó a construir un mapa detallado del orden de los genes colocados uno atrás de otro de los cuatro cromosomas de la mosca de la fruta. Desde entonces se emplean las frecuencias de recombinación para elaborar mapas cromosómicos de diferentes organismos, desde virus y bacterias hasta una gran variedad de especies eucariotas.

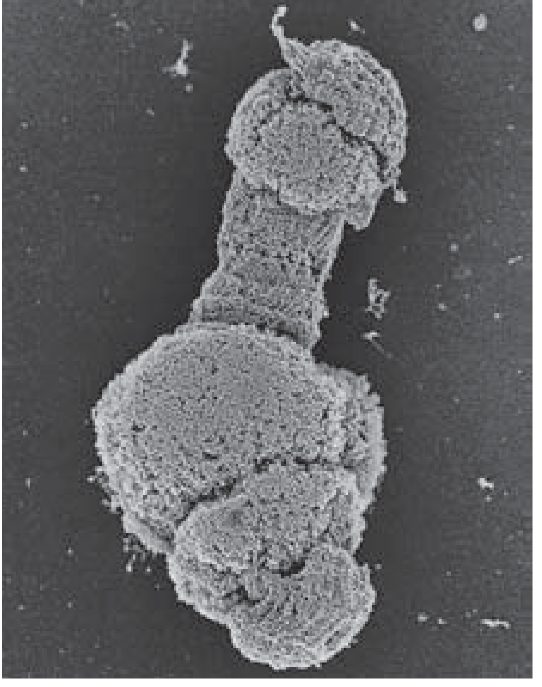
Mutagénesis y cromosomas gigantes

En la primera etapa de la genética, la búsqueda de mutantes era un procedimiento lento y tedioso dependiente de la aparición *espontánea* de genes alterados. Tras emplear una cepa especial de mosca de la fruta diseñada para revelar la presencia de alelos recesivos, H. J. Muller, de la *Indiana University*, observó en 1927 que las moscas sometidas a una dosis subletal de rayos X mostraban una frecuencia 100 veces mayor de mutación espontánea respecto de los controles. Este dato tuvo consecuencias notables. En la práctica, el uso de agentes mutágenos, como los rayos X y la radiación ultravioleta, aumentó de manera considerable el número de mutantes disponibles para la investigación en genética. Este hallazgo también puntualizó el peligro de incrementar el uso de la radiación en los campos de la industria y la medicina. En la actualidad, las mutaciones en *Drosophila* sp. aparecen más a menudo por la adición de mutágenos químicos (etilmetanosulfonato) para alimentar a los animales.

El redescubrimiento de los cromosomas gigantes de ciertas células de insectos, que efectuó en 1933 Theophilus Painter de la *University of Texas*, ilustra una propiedad básica de los sistemas biológicos. Existe una notoria variación entre los organismos, no sólo a niveles macroscópicos obvios sino también a niveles celulares y subcelulares (a menudo un tipo particular de célula puede ser mucho más adecuado para cierto tipo de investigación en comparación con todos los demás). Las células de la glándula salival de la larva *Drosophila* contienen cromosomas casi 100 veces más grandes que los observados en la mayor parte de otras células del organismo (fig. 10-8*a*). Durante el desarrollo de la larva, estas células dejan de dividirse, pero mantienen su crecimiento. La replicación del DNA continúa y provee el mate-



(a)



(b)

FIGURA 10-8 Cromosomas gigantes politénicos de la larva de insectos. *a*) Los cromosomas gigantes politénicos de la glándula salival de una larva de la mosca de la fruta muestran varios miles de bandas distintas teñidas de color oscuro. Las bandas se han identificado como los loci de genes particulares. La representación inferior muestra que los cromosomas politénicos constan de varias cadenas individuales de DNA. Las bandas teñidas sobre los cromosomas corresponden al sitio donde el DNA está compactado de modo más firme. *b*) Micrografía electrónica de barrido de un cromosoma politénico gigante procedente de una larva de *Chironomus* que muestra la expansión de sitios específicos para formar una "esponja". Los cromosomas esponjados son sitios donde se transcribe el DNA. (*A*, tomada de Biological Photo Service; *B*, cortesía de Terry D. Allen y Claus Pelling, J Cell Science, portada del vol. 93, parte 4, 1989.)

rial genético adicional necesario para conservar los altos niveles de actividad secretora de estas células gigantes. Las cadenas del DNA duplicado permanecen unidas en un ordenamiento perfecto lado con lado (recuadro de la figura 10-8*a*) y crean un cromosoma gigante, tan grande como 1 024 veces el número de cadenas de DNA de los cromosomas normales.

Estos cromosomas raros, llamados **cromosomas politénicos**, tienen detalles visuales abundantes y en ellos se reconocen alrededor de 5 000 bandas cuando se tiñen y examinan al microscopio. El patrón de bandeo es esencialmente constante de un individuo al próximo, pero se observan diferencias entre los cromosomas de las moscas de diferentes especies del género *Drosophila*. Painter pronto advirtió que ciertas bandas individuales podían correlacionarse con genes específicos. La posición relativa de los genes sobre los cromosomas gigantes concuerda con la posición pronosticada en mapas genéticos preparados de acuerdo con la frecuencia de recombinación, lo que confirma de manera morfológica la validez de todo el procedimiento de mapeo cromosómico.

Los cromosomas gigantes de los insectos también son útiles por esta razón. Al comparar los patrones de bandas de cromosomas politénicos de diferentes especies se tiene la oportunidad sin igual de investigar cambios evolutivos a nivel del cromosoma. Además, estos cromosomas no son objetos celulares inertes, sino más bien estructuras dinámicas en las cuales regiones definidas se "esponjan" durante etapas particulares del desarrollo (fig. 10-8*b*). Estos cromosomas esponjados son sitios en los que el DNA se transcribe a un nivel muy alto, lo cual representa uno de los mejores sistemas disponibles para la visualización directa de la expresión de genes (véase fig. 18-21*a*).

REVISIÓN ?

1. ¿Qué es un grupo de ligamiento?, ¿cuál es su relación con un cromosoma?, ¿cómo se puede determinar el número de grupos de ligamiento en una especie?
2. ¿De qué manera las mutaciones genéticas ayudan al mapeo y localización de genes en el cromosoma?
3. ¿Qué se entiende por ligamiento incompleto?, ¿qué relación guarda lo anterior con la formación de parejas de cromosomas homólogos durante la meiosis?
4. ¿Qué hace diferente a un cromosoma politénico de un insecto de un cromosoma normal?

10.3 LA NATURALEZA QUÍMICA DEL GEN

Los genetistas descubrieron las reglas que rigen la transmisión de las características genéticas y la relación entre genes y cromosomas. En su discurso de aceptación del premio Nobel de 1934, T. H. Morgan señaló: "En el nivel en que se encuentran los experimentos de genética no representa diferencia alguna si el gen es una unidad hipotética o una partícula material". Sin embargo, en el decenio de 1940 se plantearon nuevas preguntas, la más relevante de las cuales fue la siguiente: "¿cuál es la naturaleza química del gen?" Los experimentos que condujeron a la resolución de esta pregunta se presentan en la sección Vías experimentales de este capítulo. Una vez que fue evidente que los genes estaban formados por DNA, los biólogos se enfrentaron con una multitud de nuevas preguntas. De éstas se ocupa el resto del capítulo.

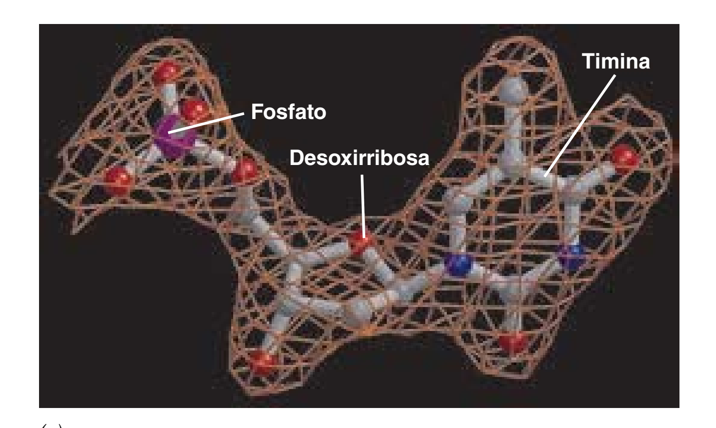
La estructura del DNA

Para entender la actividad de una macromolécula compleja (sea una proteína, polisacárido, lípido o ácido nucleico) es esencial conocer la forma en que se integra esta molécula. En el misterio de la estructura del DNA se concentraron un gran número de laboratorios de Estados Unidos e Inglaterra a principios de 1950; al final, la incógnita la despejaron James Watson y Francis Crick de la *Cambridge University* en 1953. Antes de describir su propuesta de la estructura del DNA hay que considerar los hechos que estaban disponibles en esos años.

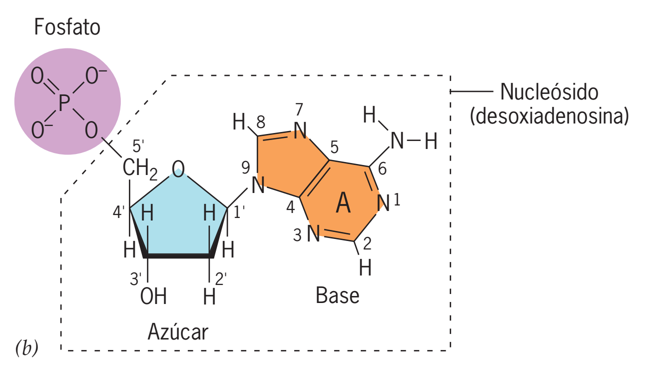
Composición de bases Se sabía que la unidad básica para construir DNA era un **nucleótido** (fig. 10-9*a*, *b*), que consiste en un azúcar de cinco carbonos conocido como *desoxirribosa*, al cual se fijaba un fosfato esterificado en la posición 5′ del anillo de azúcar y una base nitrogenada en el sitio 1′.[2] Existen dos tipos de bases nitrogenadas presentes en un ácido nucleico, las **pirimidinas**, que contienen un solo anillo, y las **purinas**, las cuales poseen dos anillos (fig. 10-9*c*). El DNA contiene dos diferentes pirimidinas, la *timina* (*T*) y la *citosina* (*C*), y dos distintas purinas, *guanina* (*G*) y *adenina* (*A*). Se sabía que los nucleótidos estaban unidos de forma covalente el uno con el otro y formaban un polímero lineal o *cadena*, con un esqueleto compuesto de azúcares que se alternaban y grupos fosfato unidos por *enlaces del tipo 3′-5′ fosfodiéster* (fig. 10-9*c*). Se presuponía que las bases unidas a cada azúcar se proyectaban desde el esqueleto y semejaban una columna de estructuras apiladas.

Los nucleótidos tienen una estructura polarizada: un extremo donde se localiza el fosfato y se conoce como el *extremo 5′* ("extremo cinco prima terminal"), mientras el otro extremo es el *3′ terminal* (fig. 10-9*b*). Puesto que todos los nucleótidos apilados de la cadena miran hacia el mismo lado, toda la cadena tiene una dirección. Un extremo es el 3′ y el otro el 5′ (fig. 10-9*c*). Los análisis de difracción de rayos X indicaban que la distancia entre los nucleótidos de aquellos que están apilados era de unos 3.4 Å (0.34 nm) y sugerían la presencia de una estructura larga repetida cada 3.4 nm.

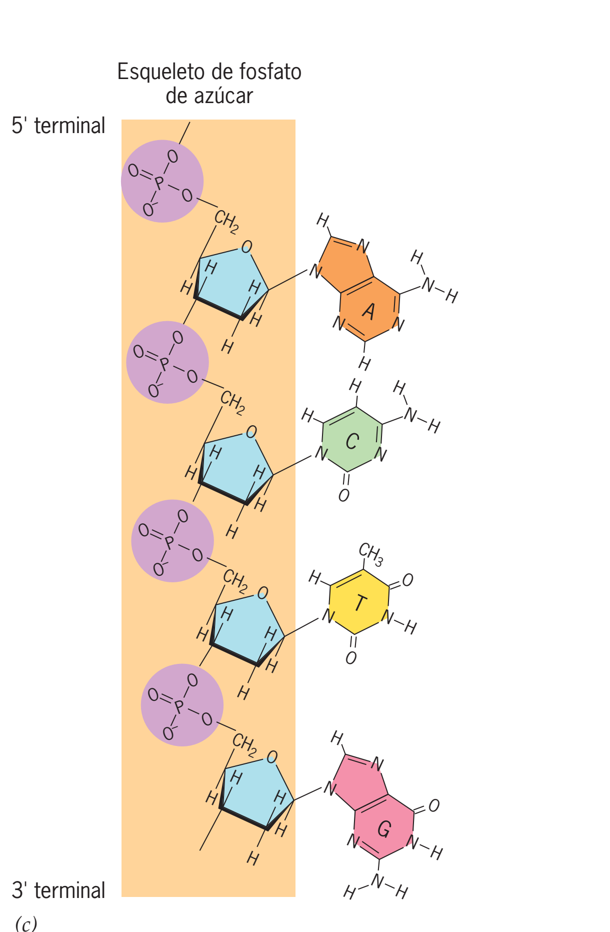
[2] En este punto es útil introducir un poco de terminología. Una molécula que sólo contiene una de las cuatro bases nitrogenadas de la figura 10-9 unida a una fracción de azúcar pentosa se conoce como nucleósido. Si el azúcar es una desoxirribosa, el nucleósido es un desoxirribonucleósido. Son cuatro los principales desoxirribonucleósidos según sea la base a la cual están unidos: desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina y desoxicitidina. Si el nucleósido posee uno o más grupos fosfato unidos (por lo regular en la posición 5′, pero de forma alternativa en la posición 3′), la molécula es un nucleótido. Hay 5′-monofosfato de nucleósido, 5′-difosfato de nucleósido y 5′-trifosfato de nucleósido, según sea el número de fosfatos en la molécula. Los ejemplos de cada uno son el 5′-monofosfato de desoxiadenosina (dAMP), 5′-difosfato de desoxiguanosina (dGDP) y 5′-trifosfato de desoxicitidina (dCTP). Un conjunto similar de nucleósidos y nucleótidos que participan en el metabolismo del RNA contiene el azúcar ribosa en lugar de desoxirribosa. Los nucleótidos como el ATP utilizados en el metabolismo energético son moléculas que contienen ribosa.



(a)



(b)



(c)

FIGURA 10-9 Estructura química del DNA. *a*) Modelo de un nucleótido de DNA que contiene la base timina; la molécula es 5′-monofosfato de desoxitimidina (dTMP). La estructura, similar a una red, representa la densidad electrónica de los átomos que forman la molécula. *b*) Estructura química de un nucleótido de DNA que contiene la base adenosina; la molécula es 5′-monofosfato de desoxiadenosina (dAMP). Un nucleótido se compone de un nucleósido unido a un fosfato; la porción del nucleósido de la molécula (p. ej., desoxiadenosina) está encerrada por una línea punteada. *c*) Estructura química de un pequeño segmento de una cadena sencilla de DNA que representa los cuatro nucleótidos. (*A*, REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE ARNON LAVIE ET AL., NATURE STR BIOL 1997;4:604; © 1997 MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)

Como se describe en la página 422, se pensó por muchos años que el DNA poseía una estructura simple de repeticiones tetranucleotídicas (p. ej., —ATGCATGCATGC—), lo cual impidió que se le considerara macromolécula portadora de información. En 1950, Erwin Chargaff de la *Columbia University* notificó un notable hallazgo que eliminó por fin la teoría del tetranucleótido y proporcionó información de importancia vital acerca de la estructura del DNA. Chargaff, creyendo que la secuencia de nucleótidos del DNA era la clave de su importancia, determinó la cantidad relativa de cada base en diversas muestras de DNA, es decir, la **composición de bases** de las muestras. El análisis de composición de bases se llevó a cabo por hidrólisis de las bases fijas de los azúcares, se aislaron éstas del hidrolizado mediante cromatografía en papel y se cuantificó la cantidad de material en cada uno de los cuatro puntos hacia los que migraron las cuatro bases.

Si la teoría del tetranucleótido era correcta, la proporción de cada base en un DNA debía ser casi de 25% de la cantidad total. Chargaff encontró que la relación de las cuatro bases fue muy distinta de un tipo de organismo a otro y a menudo se apartaba en grado notable de la relación 1:1:1:1 predicha para la teoría del tetranucleótido. Por ejemplo, la relación A:G del DNA de un bacilo de la tuberculosis fue 0.4, pero la relación A:G del DNA humano fue 1.56. La composición de bases permanecía constante en dichas especies sin que el tejido empleado como fuente de DNA hiciera diferencia alguna. Dentro de esta gran variedad de las bases que componen diferentes especies de DNA se descubrió una importante relación médica. En una muestra determinada de DNA, el número de purinas siempre es igual al número de pirimidinas. De manera más específica, el número de adeninas siempre fue igual al número de timinas y el número de guaninas siempre semejó al de las citosinas. En otras palabras, Chargaff descubrió las siguientes reglas en la composición de bases del DNA:

$$[A] = [T], [G] = [C], [A] + [T] \neq [G] + [C]$$

Los datos de Chargaff arrojaron nueva información sobre la molécula de DNA y le confirió especificidad e individualidad de un organismo a otro. Sin embargo, el significado de la equivalencia de base todavía no era muy claro.

La propuesta de Watson y Crick

Cuando se analizó la estructura de las proteínas en el capítulo 2, se subrayó la importancia de las estructuras secundaria y terciaria como determinantes de la actividad de la proteína. De manera semejante, la información acerca de la organización tridimensional de la molécula de DNA fue necesaria para entender su actividad biológica. Tras utilizar los datos de difracción de rayos X (obtenidos por Rosalind Franklin y Maurice Wilkins en el *King's College* de Londres) y tomar en cuenta la construcción de modelos aceptables a partir de las estructuras de los cuatro tipos de nucleótidos, Watson y Crick propusieron un modelo de la estructura del DNA que incluye los siguientes elementos (fig. 10-10):

1. La molécula se integra con dos cadenas de nucleótidos. A esta propuesta le siguió casi de inmediato otra errónea de Linus Pauling, que sugirió que el DNA se componía de tres cadenas de nucleótidos.
2. Las dos cadenas se enrollan en espiral una alrededor de la otra, formando un par de hélices derechas. En una hélice derecha, un observador que mire el eje central de la molécula verá que cada cadena sigue una trayectoria en el sentido de las manecillas del reloj a medida que se aleja del observador. La naturaleza helicoidal del DNA quedó de manifiesto por un patrón de puntos generado por difracción de rayos X de Franklin (como se muestra en la página 388), el cual se le mostró a Watson durante su visita al *King's College*.
3. Las dos cadenas comprenden una doble hélice que discurre en dirección opuesta, esto es, son *antiparalelas*. Esto significa que si una cadena está alineada en la dirección 5′ → 3′, la cadena compañera debe estar alineada en dirección 3′ → 5′.
4. El esqueleto (azúcar-fosfato-azúcar-fosfato) se localiza en el exterior de la molécula con dos grupos de bases que se proyectan hacia el centro. Los grupos fosfato confieren a la molécula carga negativa.
5. Las bases ocupan planos más o menos perpendiculares al eje longitudinal de la molécula y por lo tanto se colocan una sobre otra como platos apilados. Las interacciones hidrófobas y las fuerzas de van der Waals (pág. 35) entre las bases planares apiladas suministran estabilidad a la molécula del DNA. Las vueltas helicoidales y los pares de bases planares en su conjunto confieren a la molécula la semejanza de una escalera de caracol. Esta construcción es evidente en la fotografía que aparece al principio de este capítulo, que muestra el modelo original de Watson y Crick.
6. Las dos cadenas se conservan unidas mediante puentes de hidrógeno entre las bases de una cadena y sus correspondientes bases sobre la otra cadena. Un puente de hidrógeno, por sí solo, es débil y fácil de romper, lo que posibilita la

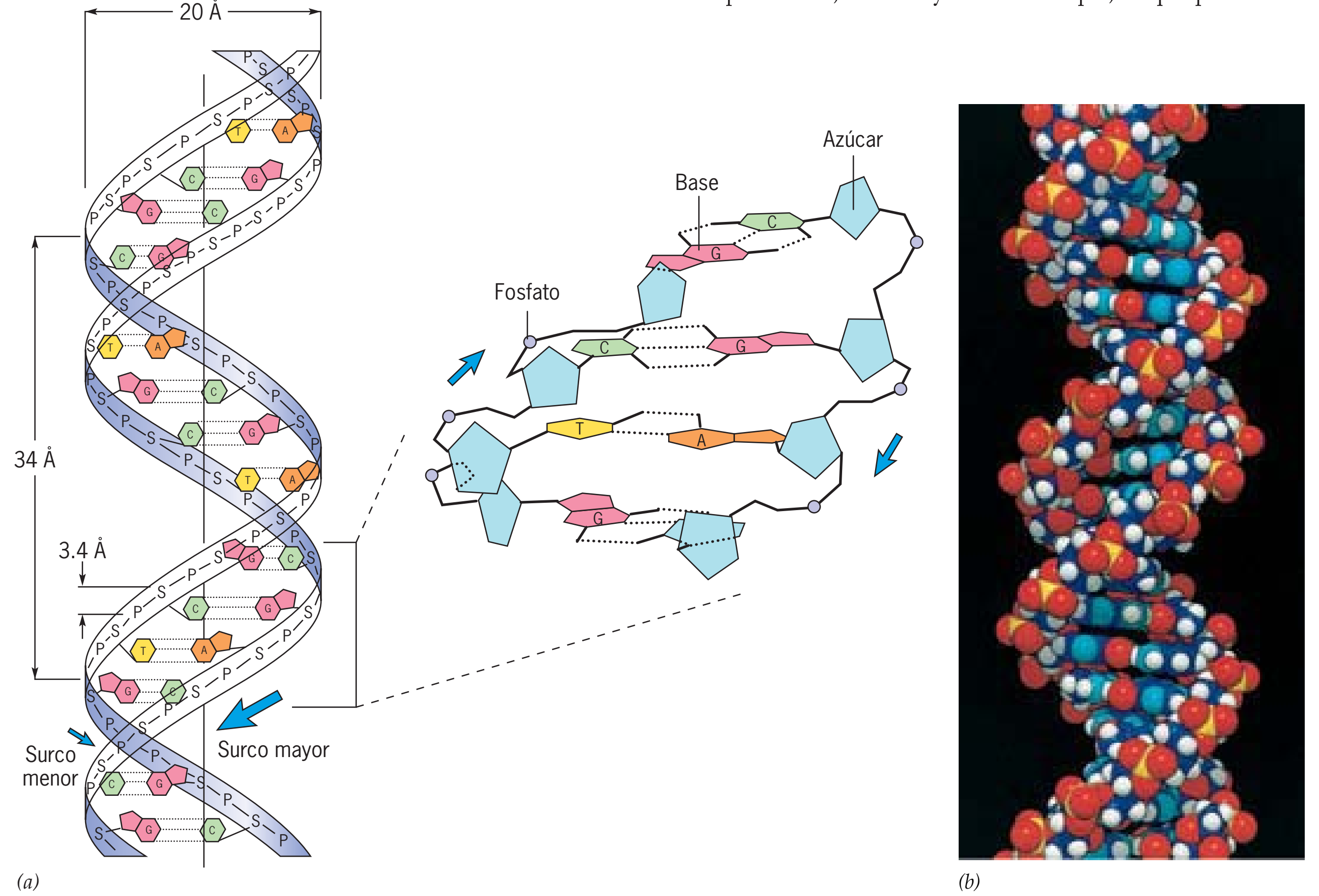
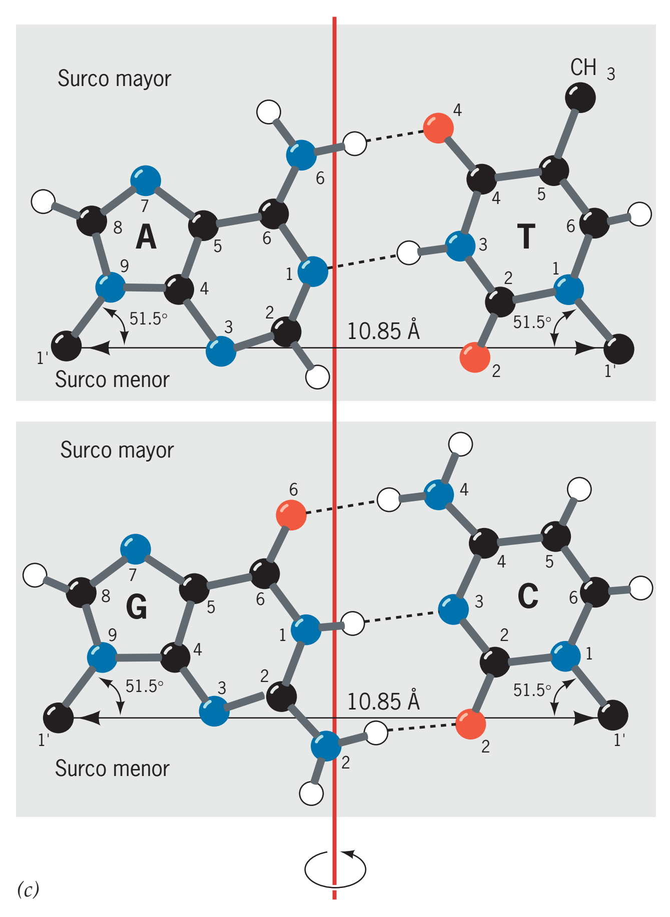
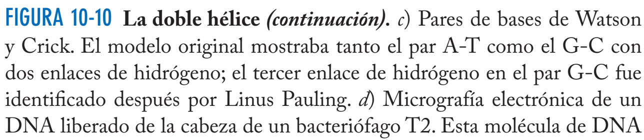
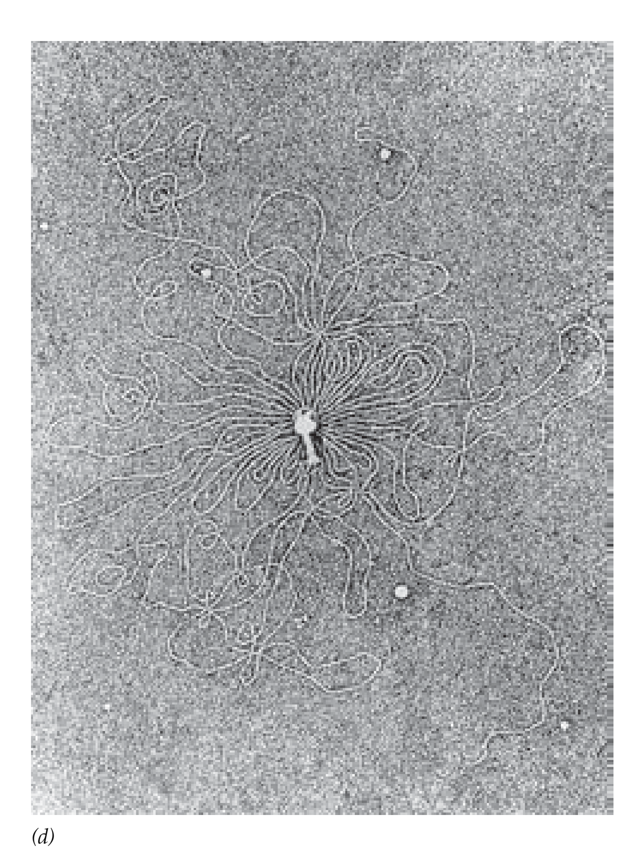


FIGURA 10-10 La doble hélice. *a*) Representación esquemática de la doble hélice del DNA. *b*) Modelo de espacio lleno de la forma B del DNA (*B*, CORTESÍA DE NELSON MAX, LAWRENCE LIVERMORE NATIONAL LABORATORY Y DEPARTMENT OF ENERGY.) *(continúa)*





(c)



(d)

FIGURA 10-10 La doble hélice *(continuación).* *c*) Pares de bases de Watson y Crick. El modelo original mostraba tanto el par A-T como el G-C con dos enlaces de hidrógeno; el tercer enlace de hidrógeno en el par G-C fue identificado después por Linus Pauling. *d*) Micrografía electrónica de un DNA liberado de la cabeza de un bacteriófago T2. Esta molécula de DNA lineal (nótense los dos extremos libres) mide 68 μm de longitud, cerca de 60 veces más larga que la cabeza del fago en la cual está contenida. (*C*, TOMADA DE D. VOET Y J. G. VOET, BIOCHEMISTRY, 2D ED.; © 1995, JOHN WILEY & SONS, INC., REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN; *D*, CORTESÍA DE A. K. KLEINSCHMIDT ET AL., BIOCHIM BIOPHYS ACTA 61:861, 1962.)

separación de las cadenas de DNA durante ciertas funciones. Al mismo tiempo, la fuerza de los puentes de hidrógeno es aditiva, de modo que un gran número de ellos mantiene las cadenas juntas y confieren la estabilidad a la doble hélice de la molécula de DNA.

7. La distancia del esqueleto del átomo de fosfato al centro del eje es de 1 nm (en consecuencia, el ancho de la doble hélice es de 2 nm).
8. Una pirimidina en una cadena está siempre apareada con una purina en la cadena complementaria. Este ordenamiento produce una molécula que es de 2 nm de ancho a lo largo de toda su estructura.
9. Los átomos de nitrógeno unidos al cuarto carbono de la citosina y al sexto de la adenina muestran de manera predominante la configuración amino (NH_2) (fig. 10-9*c*) y no la forma imino (NH). De manera similar, los átomos de oxígeno unidos al carbono sexto de la guanina y el cuarto de la timina de modo predominante muestran configuración ceto (C═O) en vez de enol (C—OH). Estas restricciones estructurales de la configuración de las bases sugieren que la única purina capaz de unirse a la timina desde el punto de vista estructural es adenina y que la guanina es la única purina capaz de unirse a la citosina. Por lo tanto, los únicos pares posibles son A-T y G-C (fig. 10-10*c*), que satisfacen de manera perfecta el análisis previo de la composición de bases efectuado por Chargaff. Debido a que los pares de bases A-T y G-C tienen la misma geometría (fig. 10-10*c*), no hay restricciones acerca de la secuencia de bases; una molécula de DNA puede tener cualquiera de una variedad ilimitada de secuencias de nucleótidos.
10. Los espacios entre los giros que forman la hélice crean dos surcos de diferente amplitud (un surco más amplio llamado *surco mayor* y uno más estrecho denominado *surco menor*) que rodean en espiral la superficie externa de la doble hélice. Las proteínas que se unen al DNA ocupan a menudo sus surcos. En muchos casos, una proteína unida a un surco es capaz de leer la secuencia de nucleótidos a lo largo del DNA sin tener que separarse de las cadenas.
11. La doble hélice realiza una vuelta completa cada 10 residuos de nucleótido (3.4 nm) o 150 vueltas por cada millón de daltones de masa molecular.
12. Debido a que una A en una cadena está siempre unida a una T en la otra cadena, y una G a una C, la secuencia de nucleótidos de las dos cadenas está siempre fija en relación

con la otra. Debido a esta relación, se dice que las dos cadenas de la doble hélice son **complementarias entre sí**. Por ejemplo, una A es complementaria de una T, *5′*-AGC-3′ es complementaria de 3′-TCG-5′ y una cadena entera es complementaria de la otra. Como se menciona más adelante, la complementariedad es de gran importancia en casi todas las actividades y los mecanismos en los cuales intervienen los ácidos nucleicos.

La importancia de la propuesta de Watson y Crick Desde la primera vez que los biólogos consideraron al DNA como material genético, definieron tres funciones principales que debía cumplir (fig. 10-11):

1. ***Almacén de la información genética.*** Como material genético, el DNA debe contener un registro grabado de instrucciones que determina todas las características heredables que un organismo puede exhibir. En términos moleculares, el DNA debe contener la información para el orden específico de aminoácidos de todas las proteínas que sintetiza el organismo.
2. ***Replicación y herencia.*** El DNA debe contener la información para la síntesis de nuevas cadenas de DNA (replicación). La replicación del DNA permite que las instrucciones genéticas se transmitan de una célula a sus células hijas y, de esta forma, de un individuo a su descendencia.
3. ***La expresión del mensaje genético.*** El DNA es más que un centro de almacenamiento; también funge como director de la actividad celular. Por consecuencia, la información codificada del DNA tiene que expresarse de alguna forma que tome parte en los sucesos internos de la célula. De manera más específica, la información del DNA debe usarse para dirigir el orden por medio del cual los aminoácidos específicos se incorporan dentro de una cadena polipeptídica.

El modelo de la estructura del DNA de Watson y Crick fue de suma importancia para conocer de qué manera se llevaban a cabo las dos primeras de estas tres funciones genéticas. El modelo apoyaba las presuposiciones de que la información contenida en el DNA residía en una secuencia lineal en sus bases. A cada gen corresponde determinado segmento de DNA. La secuencia específica de nucleótidos en dicho segmento dictaría la secuencia de aminoácidos en el polipéptido correspondiente. Un cambio de la secuencia lineal de los nucleótidos de dicho segmento provocaría una mutación hereditaria en dicho gen. Se pensó que las diferencias en la secuencia nucleotídica formaban la base de la variación genética, entre individuos de una especie o entre las mismas especies.

Del mismo modo que para la segunda función, la publicación inicial de la estructura del DNA de Watson y Crick incluyó la propuesta que explicaba cómo podría replicarse esta molécula. Estos investigadores sugirieron que durante la replicación los enlaces de hidrógeno que mantienen a las dos cadenas de hélices de DNA deberían romperse de manera secuencial, lo que ocasionaría una separación gradual de las cadenas (como la separación de las dos mitades de una cremallera). Cada una de las cadenas separadas, con sus bases de nitrógeno expuestas, debería entonces servir como una *plantilla* o molde que dirigiera el orden en el cual los nucleótidos complementarios se ensamblarían para formar la cadena complementaria. Cuando el proceso se completa deben generarse dos moléculas de DNA de doble cadena

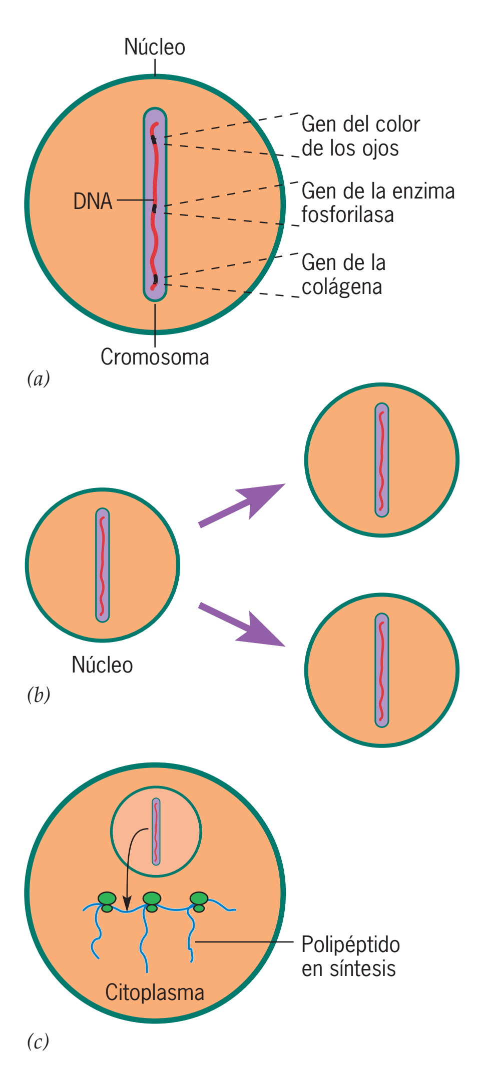


FIGURA 10-11 Tres funciones necesarias del material genético. *a*) El DNA debe contener la información que codifica las características hereditarias. *b*) El DNA debe reunir la información que dirige su propia duplicación. *c*) El DNA debe alojar la información que dirige el ensamble de proteínas específicas.

que son: a) idénticas la una a la otra y b) idénticas a la molécula del DNA original. De acuerdo con la propuesta de Watson y Crick, cada doble hélice de DNA debería contener una cadena de la molécula de DNA original y una cadena sintetizada de nueva cuenta (véase fig. 13-1). Como se describe en el capítulo 13, la propuesta de Watson y Crick predijo el mecanismo de duplicación del DNA. De las tres funciones primarias mencionadas antes, sólo un mecanismo de control del ensamblado del DNA para formar una proteína específica permaneció en el más absoluto misterio.

La dilucidación de la estructura del DNA no sólo fue importante por sí misma, sino que también estimuló la investigación de toda la actividad donde debía participar material genético. Una vez aceptado el modelo estructural, la teoría del código genético, la síntesis del DNA o la transferencia de información debían concordar con dicha estructura.

DNA superenrollado

En 1963, Jerome Vinograd y colaboradores del *California Institute of Technology* descubrieron que dos moléculas de DNA circular de idéntica masa molecular podían demostrar grados muy diferentes de sedimentación durante la centrifugación (sección 18.10). Análisis posteriores indicaron que la molécula de DNA que se sedimenta con mayor rapidez tiene una forma más compacta debido a que la molécula se enrolló sobre sí misma (fig. 10-12*a*, *b*), algo muy parecido a una liga cuyos dos extremos se enrollan en direcciones opuestas o un cable de teléfono enrollado sobre sí mismo luego de usarse. Este estado del DNA se conoce como **superenrollado**. Así el DNA es más compacto que su contraparte relajada, ocupa menos volumen y se mueve más rápido en un campo de fuerza centrífuga o eléctrica (fig. 10-12*c*).

La estructura superenrollada se entiende mejor cuando se traza un tramo de la doble hélice de DNA sobre una superficie plana. En estas condiciones, una molécula posee el número estándar de 10 pares de bases por vuelta de hélice y se dice que está *relajada.* Si los extremos de las dos cadenas se fusionaran para formar un círculo, el DNA aún permanecería relajado. Sin embargo, considérese lo que pasaría si *antes* de unir los dos extremos se torciera la molécula. Si se tuerce el DNA a lo largo y en dirección opuesta a la cual están enrollados los dobletes, la molécula tiende a desenrollarse. Una molécula de DNA *desenrollada* tiene mayor número de pares de bases por vuelta de hélice (fig. 10-13). Debido a que la molécula es más estable con 10 residuos por vuelta, tiende a oponerse al esfuerzo para desenrollarla, vuelve a enrollarse sobre sí misma y posee una conformación superenrollada (fig. 10-13).

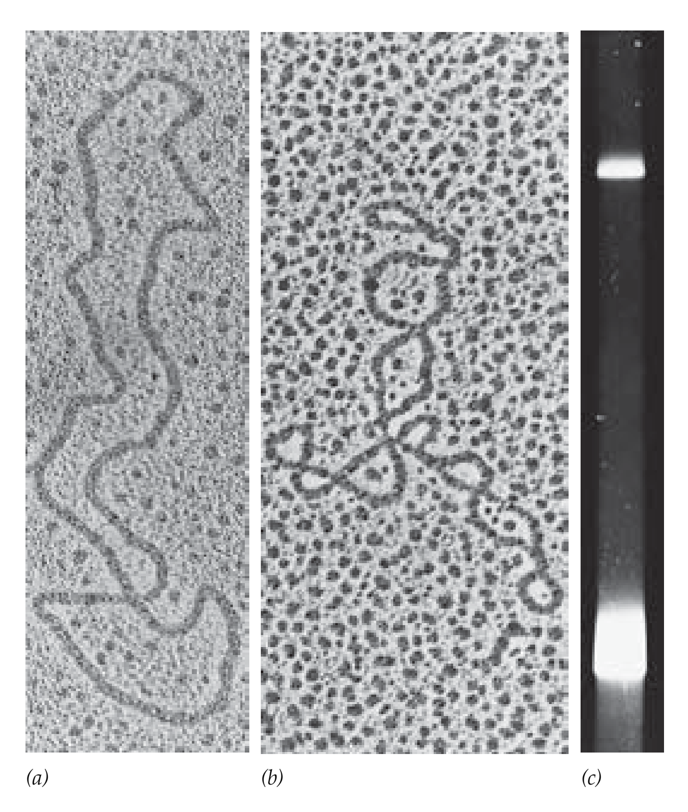


FIGURA 10-12 DNA superenrollado. *a* y *b*) Micrografías electrónicas que muestran las diferencias de conformación entre una forma relajada, una molécula circular de un fago de DNA *a* y el mismo tipo de molécula en un estado superenrollado *b*. *c*) Cuando una mezcla de moléculas de DNA SV40, relajadas o superenrolladas, se somete a electroforesis en gel, la forma superenrollada del DNA altamente compactado (en la base del gel) se mueve con mucha mayor rapidez que la forma relajada. Las moléculas de DNA se visualizan por tinción del gel con bromuro de etidio, una molécula fluorescente que se inserta en la doble hélice. (*A* Y *B*, CORTESÍA DE JAMES C. WANG; *C*, TOMADA DE WALTER KELLER, PROC NAT'L ACAD SCI USA 72-2553, 1975.)

Se dice que el DNA *superenrollado* es *negativo* cuando se genera por *desenrollamiento* y *positivo* cuando se forma por retorcimiento excesivo. El DNA circular presente en la naturaleza (p. ej., mitocondrial, viral, bacteriano) invariablemente presenta conformación de superenrollamiento negativo. El enrollamiento excesivo no se restringe al DNA circular pequeño, sino que también ocurre en el DNA lineal eucariota. Por ejemplo, el superenrollamiento negativo tiene un papel clave para permitir que el DNA de los cromosomas se compacte y llene los confines del pequeño núcleo celular (sección 12.1). Puesto que el DNA superenrollado de forma negativa está destorcido, ejerce una presión que separa las dos cadenas de la hélice, la separación que se requiere durante la replicación (síntesis de DNA) y la transcripción (síntesis de ácido ribonucleico, RNA).

Las células dependen de enzimas para cambiar el estado de superenrollamiento del DNA dúplex. Estas enzimas se conocen como **topoisomerasas** debido a que cambian la *topología* del DNA. Las células contienen diferentes topoisomerasas, las cuales se pueden dividir en dos clases. Las *topoisomerasas de tipo I* cambian el estado de superenrollamiento de la molécula de DNA tras crear una rotura transitoria en una cadena del dúplex. Un modelo para el mecanismo de acción de la topoisomerasa I humana se muestra en la figura 10-14*a*. La enzima corta una cadena del DNA y entonces permite que la cadena intacta complementaria sufra una rotación controlada, la cual relaja la molécula superenrollada. La topoisomerasa I es esencial para los procesos como la replicación de DNA y la transcripción. Funcionan estas actividades porque previenen el superenrollamiento excesivo que se desarrolla por las cadenas complementarias de un dúplex de DNA separado y desenrollado (como se ilustra en la

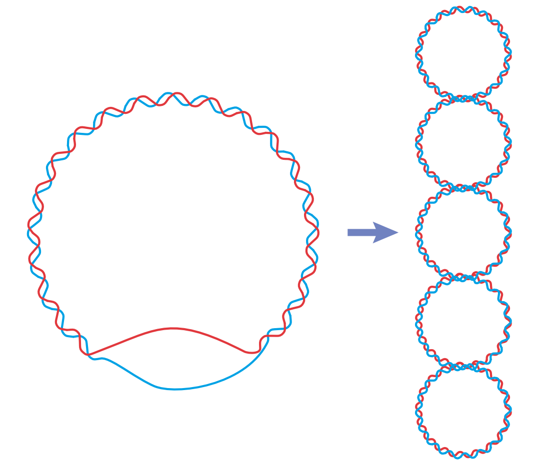


FIGURA 10-13 DNA desenrollado. La molécula del DNA de la izquierda está desenrollada; tiene un promedio de 10 pares de bases por vuelta de una hélice. Una molécula desenrollada de manera espontánea asume una conformación superenrollada negativa, como se muestra a la derecha.

Eliminación del superenrollamiento

(a)

Segmento T

Segmento G

ATPasa

ATP (*)

ADP + P_i

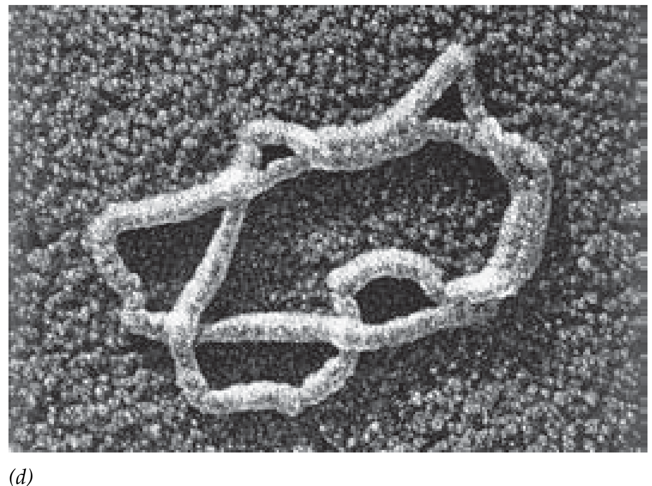
(b)

(1)

(2)

(3)

(c)



(d)

FIGURA 10-14 Las topoisomerasas del DNA. *a*) Un modelo que ilustra la acción de la topoisomerasa I humana. La enzima ha cortado una de las cadenas de DNA, la cual gira alrededor del enlace fosfodiéster en la cadena intacta. La cadena cortada vuelve entonces otra vez a religarse. (Nota: el dibujo muestra una topoisomerasa de tipo IB; las enzimas de tipo IA encontradas en bacterias actúan por un mecanismo diferente.) *b*) Un modelo molecular basado en cristalografía de rayos X muestra la acción de la topoisomerasa II. En el paso 1, la enzima dimérica tiene una conformación "abierta" lista para unirse al segmento G del DNA, así nombrado porque establece el punto de partida a través del cual pasa el segmento T-DNA (o DNA transportado). En el paso 2, la enzima ha sufrido un cambio conformacional cuando se une al segmento G. En los pasos 3 y 4, la enzima se une a una molécula de ATP, el segmento G se corta y el segmento T se traslada a través de la "compuerta" abierta. El estado de rotura representa un intermediario hipotético que lleva hacia afuera el paso en el cual el segmento T se transporta a través del segmento G. En este estado, ambos extremos cortados del segmento G están unidos de manera covalente a la enzima. En el paso 5, los dos extremos del segmento G se unen de nueva cuenta y el segmento T se libera. Se ha propuesto que la hidrólisis de ATP y la liberación de ADP y fosfato inorgánico ocurren a medida que el estado de inicio se regenera. *c*) Tipos de reacciones que pueden catalizar las topoisomerasas. La parte 1 ilustra las reacciones de superenrollamiento y relajación; la parte 2 las reacciones de anudación y desanudación; la parte 3 las reacciones de formación de concatámeros y desconcatenación. *d*) Micrografía electrónica de un par de moléculas de DNA circulares interconectadas (concatenadas). Las moléculas de este tipo se acumulan en bacterias que carecen de una topoisomerasa específica. (*A*, REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE D. A. KOSTER, ET AL., NATURE 434:671, 2005; © COPYRIGHT 2005, MACMILLAN MAGAZINES LTD; *B*, REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE J. M. BERGER ET AL., NATURE 379:231, 1997; © COPYRIGHT 1997, MACMILLAN MAGAZINES LTD; *D*, TOMADA DE NICHOLAS COZZARELLI, CELL VOL. 71, PORTADA DEL NÚM. 2, 1992; CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS.)

figura 13-6). Las *topoisomerasas tipo II* hacen una rotura transitoria en ambas cadenas del DNA dúplex. Otro segmento de la molécula del DNA (o una molécula separada por completo) se transporta entonces a través de la rotura y las cadenas se unen de nueva cuenta. Como es de esperar, este mecanismo de acción tan complejo se acompaña de una serie de cambios conformacionales notorios que se representan en el modelo de la figura 10-14*b*. Estas enzimas son capaces de algunos "trucos" importantes. Además, dado que son capaces de superenrollar y relajar el DNA (fig. 10-14*c*, panel 1), las topoisomerasas tipo II pueden enlazar a una molécula de DNA en nudos o desanudar el DNA (fig. 10-14*c*, panel 2). Estas enzimas también pueden ocasionar que una población de círculos de DNA independientes se una (*encadene*) o separe al conectar círculos dentro de componentes independientes (fig. 10-14*c*, *d*). La topoisomerasa tipo II se

requiere para separar las moléculas de DNA antes de que los cromosomas se dupliquen para separarse durante la mitosis. Las topoisomerasas humanas del tipo II son un blanco para diferentes fármacos (p. ej., etopósido y doxorrubicina), que se unen a la enzima para prevenir el corte de las cadenas del DNA y que éstas se unan en realidad. Debido a que trabajan de esta forma, en poco tiempo estos medicamentos destruyen de manera primaria las células que se dividen y de esta forma se emplean para el tratamiento contra el cáncer.

REVISIÓN

1. ¿Qué significa que una cadena de DNA tenga polaridad, las dos cadenas sean antiparalelas, la molécula posea un surco mayor y uno menor y las cadenas sean complementarias?
2. ¿Cuál es la relación entre los análisis de la composición de bases del DNA que realizó Chargaff y la estructura de la doble hélice?
3. ¿Cómo difieren la estructura del DNA subenrollada de la enrollada y cómo las dos clases de topoisomerasas?

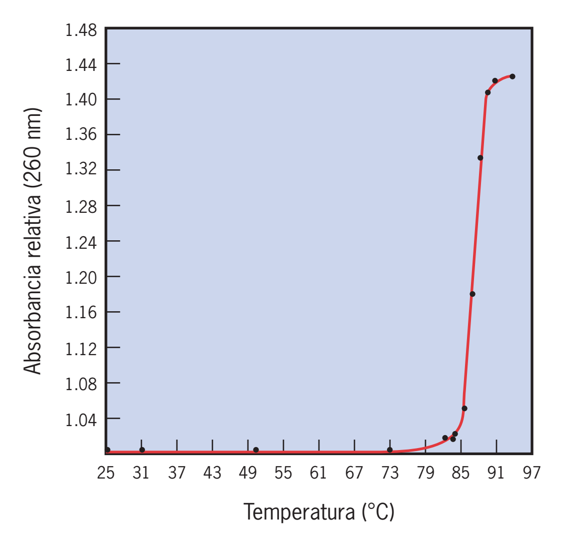


FIGURA 10-15 Desnaturalización térmica de DNA. Se muestra una curva de desnaturalización térmica para el DNA del bacteriófago T6 nativo en 0.3 M de citrato de sodio. La separación de las cadenas del DNA ocurre en límites muy estrechos de temperatura, en particular para los DNA simples de virus pequeños. La temperatura que corresponde a la mitad del incremento de la absorbancia se denomina T_m. (TOMADA DE J. MARMUR Y P. DOTY, J MOL BIOL 3:593, 1961; © 1961, CON AUTORIZACIÓN DEL EDITOR DE ACADEMIC PRESS.)

10.4 LA ESTRUCTURA DEL GENOMA

El DNA es una macromolécula: un ensamblaje de un gran número de átomos que permanecen unidos en un ordenamiento definido cuya estructura tridimensional puede precisarse mediante técnicas como la cristalografía de rayos X. Empero, el DNA también es un almacén de información, lo cual es más difícil de describir en términos moleculares. Si, como se ha señalado antes, un gen corresponde a un segmento particular de DNA, la suma de la información genética que un organismo individual hereda de sus padres es equivalente a la suma de todos los segmentos de DNA presentes en el huevo fecundado que inicia la vida. Todos los sujetos que integran una población de especies muestran el mismo grupo de genes, si bien los diferentes individuos poseen de modo invariable ligeras diferencias (alelos) de muchos de estos genes. De esta forma, cada especie de organismo muestra un contenido único de información genética, el cual se conoce como **genoma**. Para los seres humanos, el genoma es equivalente en esencia a toda la información genética presente en un solo grupo (**haploide**) de los cromosomas humanos, que incluye 22 autosomas diferentes y los cromosomas sexuales X y Y.

La complejidad del genoma

Para entender cómo se determina la complejidad del genoma, es necesario primero considerar una de las propiedades más relevantes de la doble hélice de DNA: su capacidad para separarse en las dos cadenas que lo componen, una propiedad que se denomina **desnaturalización**.

Desnaturalización del DNA Como lo sugirieron por primera vez Watson y Crick, las dos cadenas de una molécula de DNA están unidas por medio de enlaces débiles no covalentes. Cuando el DNA se disuelve en solución salina y ésta se somete a calentamiento lento, se alcanza cierta temperatura cuando las dos cadenas de DNA empiezan a separarse. Con pocos grados, el proceso suele ser completo y la solución contiene moléculas de cadena sencilla que se separan del todo de sus cadenas originales. Por lo general se cuantifica el progreso de la desnaturalización térmica (o *fusión del DNA*) por el incremento de la absorbancia de radiación ultravioleta por el DNA disuelto. Una vez que las dos cadenas de DNA se separan, las interacciones hidrófobas que resultan de las bases se reducen de manera notoria, con cambios en la estructura electrónica de las bases y mayor absorbancia de la radiación ultravioleta. El aumento de la absorbancia que acompaña a la desnaturalización del DNA se muestra en la figura 10-15. La temperatura que corresponde a la mitad del cambio de la absorbancia se llama *temperatura de fusión* (T_m). El alto contenido de GC (%G + %C) en el DNA tiene una alta T_m. Este incremento de la estabilidad del contenido GC en el DNA refleja la presencia de puentes de hidrógeno adicionales entre las bases en comparación con los pares de AT (fig. 10-10*c*).

Renaturalización del DNA La separación de las dos cadenas de DNA dúplex por calentamiento no es un hallazgo inesperado, pero la *revinculación* de cadenas sencillas en moléculas estables de doble cadena con una correcta unión de pares de bases parece casi inconcebible. Sin embargo, en 1960 Julius Marmur y colaboradores de la *Harvard University* encontraron que si enfriaban con lentitud una solución de DNA bacteriano desnaturalizado por calentamiento, el DNA obtenía de nueva cuenta las propiedades de doble hélice, es decir, absorbía menos radiación ultravioleta, otra vez funcionaba como el material genético y era capaz de transformar células bacterianas (como se analiza en la página 423). A partir de estos estudios se hizo evidente de esta forma que las moléculas complementarias de cadena senci-

lla de DNA serían capaces de reagruparse, un suceso denominado **renaturalización**. Este hallazgo ha probado ser una de las observaciones más valiosas jamás hechas en la biología molecular. Por un lado, la renaturalización ha servido como base para la investigación de la complejidad del genoma, un tema que se describe en la siguiente sección. Por otra parte, la renaturalización ha llevado al desarrollo de una metodología conocida como *hibridación de ácidos nucleicos*, en la cual las cadenas complementarias de ácidos nucleicos obtenidas de diferentes fuentes pueden mezclarse para formar moléculas de cadenas dobles (híbridas). Ejemplos de estos señalamientos se han respondido luego de permitir que las cadenas sencillas de ácidos nucleicos se hibriden como se discute más adelante en el capítulo (pág. 407) y como lo ilustra la figura 10-19. La hibridación de ácidos nucleicos juega un papel clave en la biotecnología moderna, incluidas la secuenciación, clonación y amplificación del DNA.

La complejidad de los genomas virales y bacterianos Son varios los factores que determinan la frecuencia de renaturalización de una preparación de DNA. Éstos son los siguientes: a) la fuerza iónica de la solución, b) la temperatura de incubación, c) la concentración de DNA, d) el periodo de incubación y e) el tamaño de las moléculas que interactúan. Con base en estos factores hay que considerar qué sucedería si se comparara el grado de renaturalización de tres DNA diferentes, cada uno con el genoma entero de: a) un virus pequeño, por ejemplo, MS-2 (4×10^3 pares de nucleótidos); b) un virus grande, como T4 (1.8×10^5 pares de nucleótidos), y c) una célula bacteriana como *E. coli* (4.5×10^6 pares de nucleótidos). La diferencia primaria entre estos DNA es su longitud. Para comparar su renaturalización es importante que las moléculas que reaccionan tengan una longitud equivalente, por lo general unos 1 000 pares de bases. Las moléculas de DNA pueden fragmentarse en pequeñas piezas de diferentes maneras, una de las cuales consiste en forzar el paso de estas moléculas a través de un orificio por medio de alta presión.

Cuando se permite que estos tres tipos de DNA, todos presentes con la misma longitud y concentración (p. ej., mg/ml), se vuelvan a reunir, lo hacen a diferente velocidad de unión (fig. 10-16). El genoma más pequeño tiene una desnaturalización más rápida. La razón debe ser aparente cuando se considera la concentración de las secuencias complementarias en las tres preparaciones. Debido a que las tres preparaciones poseen la misma cantidad de DNA en un volumen particular de solución, es posible inferir que cuanto menor sea el tamaño del genoma, mayor es el número de genomas en un peso particular de DNA y más probable la colisión entre los fragmentos complementarios.

La complejidad de los genomas eucariotas La renaturalización de los DNA viral y bacteriano se adecua a una curva simétrica y sencilla (fig. 10-16). La curva de renaturalización tiene esta forma porque todas las secuencias están presentes con la misma concentración (salvo unas cuantas secuencias del DNA bacteriano). Por consiguiente, en esa población cada secuencia de nucleótidos tiene una buena probabilidad de encontrar su pareja en un tiempo determinado respecto de cualquier otra secuencia. Diferentes estudios de mapeo genético sugieren que el DNA de un cromosoma contiene un gen tras otro en disposición lineal y permiten pronosticar este resultado. Los datos de genomas virales y bacterianos contrastan notable-

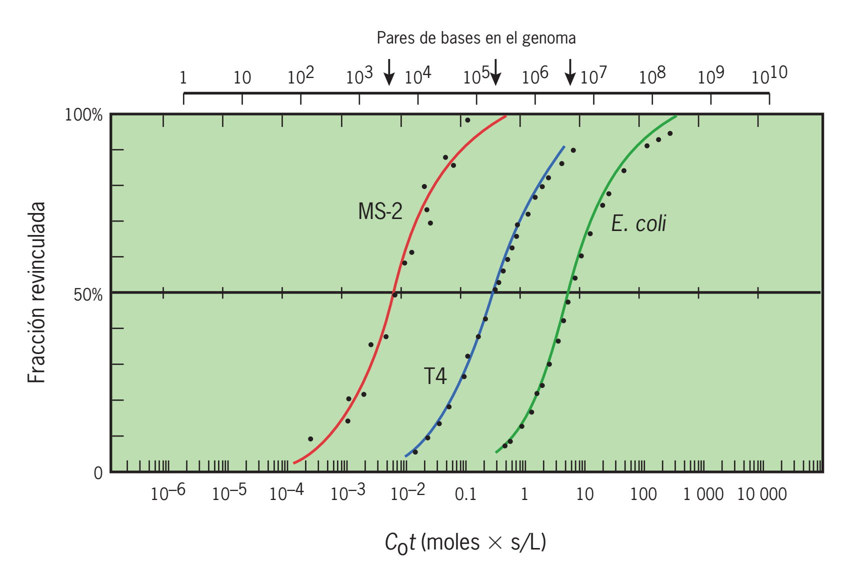


FIGURA 10-16 La cinética de la renaturalización de los DNA viral y bacteriano. Las curvas muestran la renaturalización de cadenas seccionadas de DNA de dos virus (MS-2 y T4) y una bacteria (*E. coli*). (La formación de DNA de doble cadena se traza contra C_0t, que es un término que combina dos variables, el tiempo de incubación y la concentración de DNA. Una solución con elevada concentración de DNA incubado por breve tiempo tiene la misma C_0t, tanto como una de baja concentración incubada en un lapso mayor; ambas muestran el mismo porcentaje de DNA reunido.) El tamaño del genoma, es decir, el número de pares de bases de nucleótidos presentes en una copia de toda la información genética del organismo, se indica con las flechas cerca de la escala numérica superior. La forma de cada curva de renaturalización es muy simple y muestra una sola pendiente. Sin embargo, el tiempo de renaturalización es muy diferente y depende de la concentración de fragmentos complementarios, que a su vez dependen del tamaño del genoma. Cuanto más grande sea el genoma, menor es la concentración de fragmentos complementarios en la solución y mayor el tiempo necesario para concluir la renaturalización.

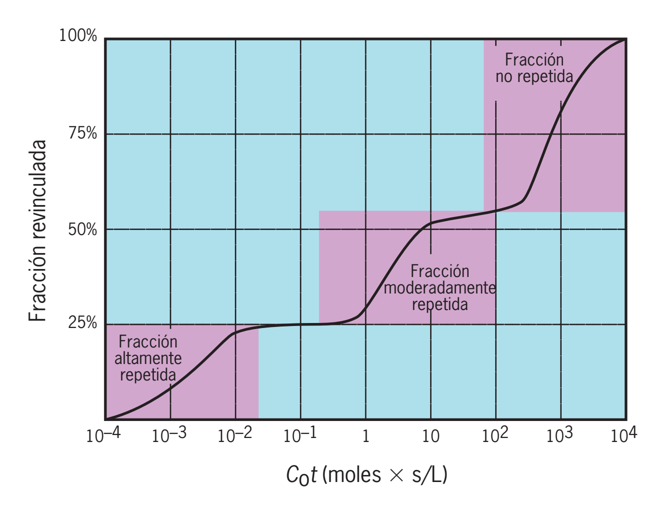


FIGURA 10-17 Gráfica idealizada de la cinética de la renaturalización del DNA eucariota. Cuando se permite que el DNA de cadena sencilla se reúna pueden distinguirse casi siempre tres clases distintas de fragmentos, reconocibles por la repetición de sus secuencias dentro del genoma: fracción de DNA altamente repetida, fracción de DNA moderadamente repetida y fracción de DNA no repetida (copias únicas). (Nota: ésta es una gráfica idealizada: las tres clases de secuencias no están separadas con claridad en una curva de renaturalización real.)

mente con los que obtuvieron Roy Britten y David Kohne del *California Institute of Technology* a partir de DNA de mamífero. A diferencia de los genomas más simples, los fragmentos del DNA de un genoma de mamífero se renaturalizan a velocidades muy distintas (fig. 10-17). Estas diferencias reflejan el hecho de que, en una preparación de fragmentos de DNA eucariota, las diferentes secuencias de nucleótidos se encuentran presentes en concentraciones muy variables. Este fue el primer indicio de que el DNA eucariota no es tan sólo la sucesión de un gen tras otro, como en las bacterias o los virus, sino una organización mucho más compleja.

Cuando se permite que fragmentos de DNA de plantas y animales se renaturalicen, la curva típica muestra casi siempre tres tipos distintos (fig. 10-17), que corresponden a la renaturalización de tres clases muy abundantes de secuencias de DNA. Las tres clases se renaturalizan a diferente velocidad porque difieren en cuanto al número de veces que su secuencia de nucleótidos se repite dentro de la población de fragmentos. Las tres clases se denominan **fracción altamente repetida**, **fracción moderadamente repetida** y **fracción no repetida**.

Secuencias de DNA muy repetidas La fracción altamente repetida consta de secuencias presentes en por lo menos 10^5 copias por genoma y por lo general contribuye casi 1 a 10% del DNA total. Por lo general, las secuencias muy repetidas son cortas (unos pocos cientos de nucleótidos en su mayor longitud) y se presentan en grupos en los que la secuencia de estudios se repite una y otra vez sin interrupción. Una secuencia dispuesta de este modo de un extremo a otro está presente en *tándem*. Las secuencias altamente repetidas pertenecen a varias categorías superpuestas, incluidos DNA satélites, DNA minisatélites y DNA microsatélites.

- **DNA satélites.** El DNA satélite posee secuencias cortas (alrededor de cinco a pocos cientos de pares de bases de longitud) que forman segmentos muy largos, cada uno con varios millones de pares de bases de DNA. En muchas especies, la composición de bases de estos segmentos de DNA es lo suficientemente diferente del resto del DNA para que estos fragmentos que contienen la secuencia puedan separarse en bandas "satélite" distintas por centrifugación de gradiente de densidad (de aquí el nombre de DNA *satélite*). Los DNA satélites tienden a aparecer muy rápido en el transcurso de la evolución, lo cual hace que las secuencias de estos elementos genómicos varíen incluso entre especies estrechamente emparentadas. La localización del DNA satélite dentro de los centrómeros de cromosomas se describe en la página 407 y la sección 12.1. A pesar de décadas de investigación, la función precisa del DNA satélite es todavía un misterio.
- **DNA minisatélites.** Las secuencias minisatélite tienen un tamaño de 10 a 100 pares de bases de longitud y se encuentran en segmentos de unas 3 000 repeticiones. Así, dichas secuencias ocupan tramos considerablemente más cortos del genoma que las secuencias satélite. Las minisatélites tienden a ser inestables, y el número de copias de una secuencia en particular a menudo aumenta o disminuye de una generación a la siguiente como resultado de entrecruzamiento desigual (véase fig. 10-21). En consecuencia, la longitud de un locus minisatélite específico es altamente variable en la población, incluso entre miembros de la misma familia. Debido a que son tan variables (o *polimórficas*) en longitud, las secuencias minisatélite constituyen la base de la técnica de *análisis de bandas de DNA*, que se emplean para identificar a criminales o en casos de paternidad (fig. 10-18).
- **DNA microsatélites.** Las microsatélites son secuencias muy cortas (de uno a cinco pares de bases de longitud) y se hallan casi siempre en pequeños segmentos de unos 10 a 40 pares de bases de longitud. Se encuentran de forma uniforme en todo el DNA: más de 100 000 diferentes loci en el genoma humano. Las enzimas de replicación de DNA tienen problemas al copiar regiones del genoma que poseen estas secuencias repetidas pequeñas, las cuales causan que estos segmentos de DNA cambien de longitud a través de las generaciones. Debido a su variable longitud dentro de la población, los DNA microsatélites se han utilizado para analizar las relaciones entre las diferentes poblaciones de grupos étnicos, como lo ilustra el siguiente ejemplo. Muchos antropólogos establecen que las especies del ser humano moderno provienen de África. Si esto es cierto, entonces los miembros de diversas poblaciones africanas deberían evidenciar una gran variación de las secuencias de DNA en comparación con las poblaciones humanas que viven en otros continentes, toda vez que los genomas de las poblaciones africanas han sufrido gran divergencia. Los argumentos de la génesis africana han recibido apoyo de estudios de secuencias de DNA humano. En un estudio que analizó 60 loci microsatélites diferentes se reconoció que otros miembros de poblaciones africanas tienen una divergencia genética notoria en comparación con las poblaciones de Asia o Europa. La vasta mayoría de los loci microsatélites se presentan fuera de los genes, y los cambios en su longitud por lo general pasan inadvertidos. La situación cambia en el caso de las secuencias microsatélite que se consideran en la sección Perspectiva humana de este capítulo.

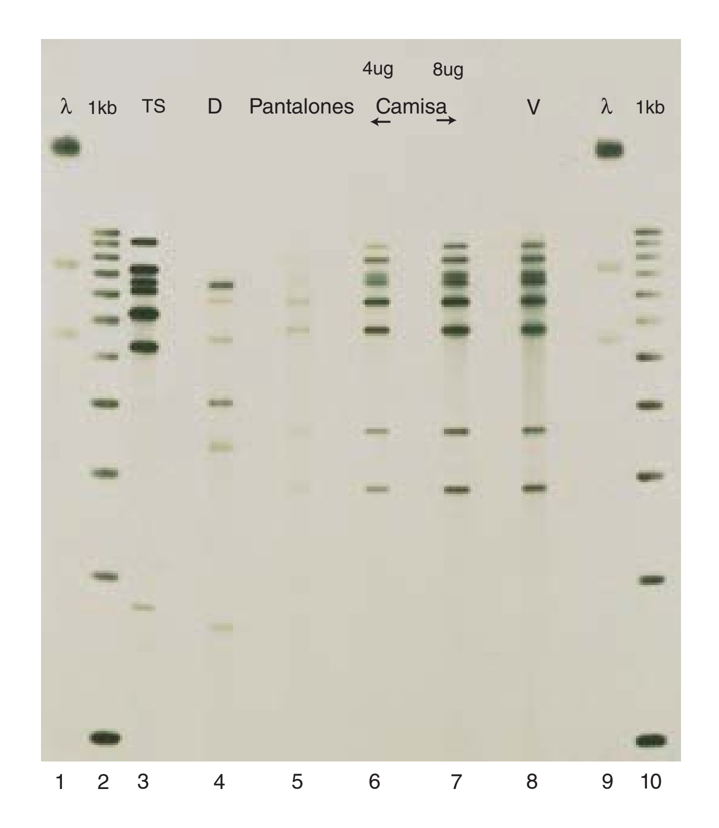


FIGURA 10-18 Huellas de DNA. En esta técnica, que se emplea de forma amplia para determinar la identidad de un individuo a partir de la muestra, el DNA se digiere mediante tratamiento con nucleasas específicas (llamadas endonucleasas de restricción, descritas en la sección 18.13) y los fragmentos de DNA se separan con base en su tamaño por electroforesis en gel. La localización de los fragmentos de DNA en el gel que contienen secuencias específicas de DNA se determina con sondas marcadas de secuencias complementarias a las que se busca. Los fragmentos de DNA que se unen a estas sondas varían en longitud de una persona a otra debido a la presencia de números variables de repeticiones en tándem (VNTR) en el genoma. Los laboratorios de medicina forense analizan alrededor de 13 loci de VNTR altamente polimórficos. La probabilidad de que dos individuos puedan tener idénticos VNTR en este locus es astronómicamente pequeña. Las huellas de DNA que se muestran en esta figura se emplearon en un caso criminal en el cual el presunto culpable enfrentó la acusación de apuñalar y dar muerte a una joven mujer. Las manchas de sangre en los pantalones y la camisa del acusado se compararon con muestras estándar conocidas de sangre de la víctima y el acusado. El DNA de las manchas de sangre encontradas en la ropa del acusado no coincidió con sus propias muestras de sangre, pero sí con las de la víctima. Las líneas contienen DNA de las siguientes fuentes: 1, 2, 3, 9 y 10 (muestras testigo de DNA que sirven como control de calidad); 4 (sangre del acusado); 5 (muestras de sangre de los pantalones del acusado); 6 y 7 (muestras de sangre de la camisa del acusado), y 8 (sangre de la víctima). (CORTESÍA DE ORCHID CELLMARK, PRINCETON, NJ.)

PERSPECTIVA HUMANA

Enfermedades que resultan de la expansión de repeticiones de trinucleótidos

Por décadas, los biólogos pensaron que los genes se transmitían siempre de generación a generación como entidades estables. En raras ocasiones, un cambio ocurría en las secuencias nucleotídicas de un gen en la línea germinal, lo que causaba una mutación heredada de manera subsecuente. Este es uno de los mecanismos básicos de la genética mendeliana. En 1991, diferentes laboratorios notificaron un nuevo tipo de "mutación dinámica" en el cual la secuencia nucleotídica de un gen en particular cambió de forma notoria entre padres y descendencia. En este caso, tales mutaciones afectaron genes que contenían una unidad de trinucleótidos repetida (p. ej., CCG o CAG) como parte de su secuencia. En la mayoría de los miembros de la población, estos genes contienen en particular un número relativamente pequeño (pero variable) de trinucleótidos repetidos y se transmiten de una generación a la siguiente sin un cambio de números repetidos. En cambio, una pequeña fracción de la población posee una versión mutante del gen que tiene un gran número de estas unidades repetidas. A diferencia de la versión normal, los alelos mutantes son muy inestables y el número de unidades repetidas tiende a incrementarse cuando el genoma pasa de un padre a su descendencia. Cuando el número de repeticiones aumenta más allá de una cifra crítica, el individuo que hereda el alelo mutante desarrolla una enfermedad grave.

En la actualidad, más de una docena de afecciones distintas se ha atribuido a la expansión de trinucleótidos repetidos. Estos trastornos pertenecen a dos categorías básicas y se describen en su momento. Las enfermedades de tipo I son anomalías neurodegenerativas que resultan de la expansión de los miembros repetidos de trinucleótidos CAG dentro de las porciones codificantes del gen mutante (fig. 1). Es posible ilustrar la naturaleza de estos padecimientos en el más prevalente y estudiado: la enfermedad de Huntington (HD). La HD es una anormalidad fatal reconocible por movimientos involuntarios y descoordinados y cambios de la personalidad, además de depresión e irritabilidad y pérdida gradual del coeficiente intelectual. Por lo regular, los síntomas empiezan de la tercera a quinta décadas de la vida y se acentúa la gravedad hasta la muerte.

El gen normal de la HD, que se transmite de manera estable, contiene entre seis y 35 copias de trinucleótidos CAG. La proteína que codifica el gen *HD* se conoce como *huntingtina* y su función exacta se desconoce hasta el momento. El CAG es un triplete que codifica al aminoácido glutamina (véase la figura 11-41 para los tripletes codificantes). De esta forma, el polipéptido huntingtina normal contiene un segmento de seis a 35 residuos de glutamina (un segmento poliglutámico) como parte de su estructura primaria. Los polipéptidos tienen una estructura primaria muy definida y la mayoría se reconoce por esa forma; empero, en condiciones habituales, la huntingtina es polimórfica en cuanto a la longitud de su segmento de poliglutamina. La proteína parece funcionar con normalidad en longitudes inferiores

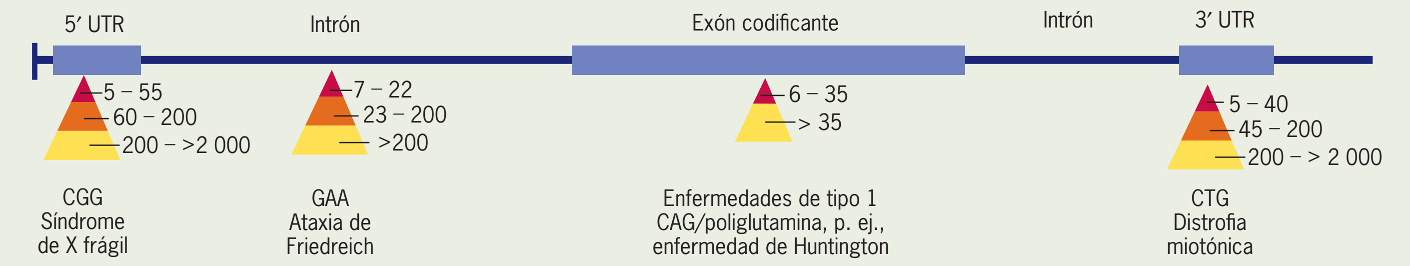


FIGURA 1 Secuencias trinucleotídicas repetidas y enfermedad humana. La parte superior muestra un gen esquemático que se transcribe en un RNA mensajero con diferentes porciones (cajas de tono púrpura), incluidos una porción 5′ no codificante llamada 5′ UTR (región 5′ no traducida), un exón codificante que lleva la información para la secuencia aminoacídica de un polipéptido y una porción no codificante 3′ (la región 3′ UTR) (pág. 448). Los intrones en el DNA no están representados en el RNA mensajero maduro. La localización general de los trinucleótidos causantes de cada una de las cuatro diferentes enfermedades (síndrome de X frágil, ataxia de Friedreich, enfermedad de Huntington y distrofia miotónica) se indican por la localización de cada pirámide. Se indica también el número de repeticiones causantes de los estados, normal (rojo), de portador (naranja) y de enfermedad (amarillo) de cada trastorno en el gen. Los genes que ocasionan las anomalías de tipo I, como la HD, no exhiben el estado "acarreador" intermediario en el cual un individuo posee un alelo inestable pero no está afectado. (Según J. L. Mandel, Nature 386:768, 1997; © 1997, Macmillan Magazines Ltd.)

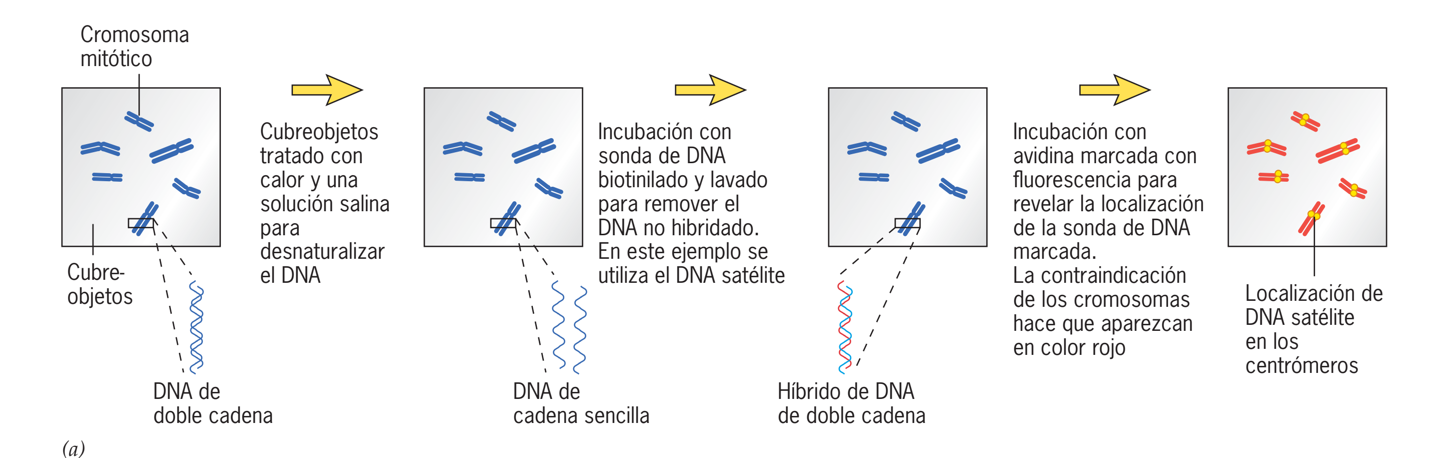
a los 35 residuos de la glutamina. Sin embargo, cuando se supera este número, la proteína adquiere nuevas propiedades y la persona se torna propensa a desarrollar la enfermedad.

La HD evidencia un número infrecuente de características. A diferencia de la mayoría de las afecciones hereditarias, la HD es un trastorno genético dominante, lo cual significa que un sujeto con el alelo mutante desarrolla la anormalidad a pesar de que tenga un alelo *HD* normal. De hecho, las personas que son homocigotas para el alelo *HD* están afectadas de manera más seria que las heterocigotas. Esta observación indica que el polipéptido de la huntingtina mutante causa el padecimiento, no tanto por la imposibilidad de llevar a cabo una función particular, sino por la adquisición de propiedades tóxicas, esto es, se trata de una mutación de *ganancia de función.* Esta interpretación tiene el apoyo de estudios en roedores. Los ratones manipulados para llevar el alelo mutante humano de la HD (además de sus propios alelos normales) desarrollan una anomalía neurodegenerativa similar a la encontrada en seres humanos. La presencia de un alelo anormal es suficiente para causar la enfermedad. Otra característica poco común de la HD y los otros trastornos CAG es un fenómeno conocido como anticipación genética, lo cual significa que, puesto que la enfermedad se transmite de generación a generación, su gravedad se incrementa y se presenta a edades más tempranas. Esta fue antes una característica difícil de reconocer en la HD, lo que ahora se explica con facilidad por el hecho de que los miembros de repeticiones CAG en un alelo mutante (y las consecuencias resultantes) aumentan a menudo de forma notable de una generación a la siguiente.

La base molecular de la HD es todavía un misterio; las teorías no pueden aún explicar cómo una secuencia expandida de glutamina puede ser tóxica para las células cerebrales. Una característica parece ser indiscutible: cuando los segmentos de poliglutamina de la huntingtina exceden los 35 residuos, la proteína (o un fragmento cortado de ésta) sufre plegamiento anormal para producir una molécula mal plegada que: a) se une a otra huntingtina mutante (o fragmentos) para formar agregados insolubles, los cuales no difieren de los identificados en los pacientes con la enfermedad de Alzheimer, y b) se une a un número de diferentes proteínas no relacionadas que no interactúan con las moléculas de huntingtina normales. Entre las proteínas unidas por la huntingtina mutante figuran varios factores transcripcionales, proteínas que intervienen en la regulación de la expresión génica. Algunos de los más importantes factores transcripcionales presentes en las células, entre ellos el TBP (véase fig. 11-19) y el CBP (véase fig. 12-46), contienen ellos mismos secuencias de poliglutamina, lo cual los hace en particular susceptibles de agregarse a proteínas mutantes que portan los segmentos de poliglutaminas. De hecho, los agregados proteicos presentes en neuronas degeneradas de pacientes con HD poseen ambos factores transcripcionales unidos. Estos resultados sugieren que los mutantes de huntingtina secuestran a estos factores transcripcionales, los remueven del resto del núcleo y alteran la transcripción de los genes requeridos para la sobrevivencia y salud de las neuronas afectadas. Esta hipótesis ha recibido apoyo de un estudio en el cual los ratones se manipularon de forma genética de tal modo que sus células cerebrales perdieron la capacidad de producir determinados factores de transcripción clave. Estos ratones sufrieron el mismo tipo de neurodegeneración como se observó en animales con un gen mutante de HD. Otros procesos neuronales básicos, incluidos el transporte axónico (fig. 9-13), la permeabilidad mitocondrial y la degradación proteínica (sección 12.7), también son perturbados por la mutación de *HD* y constituyen posibles causas de muerte de células nerviosas. Debe advertirse que varios investigadores de la HD tienen una opinión distinta acerca de la causa de la muerte celular. Argumentan que lo que es tóxico no son los agregados proteínicos, sino la proteína mutante soluble misma (o fragmentos de ella). De hecho, quienes apoyan este punto de vista sostienen que los agregados de la proteína protegen la célula al secuestrar las moléculas dañinas. Por razones prácticas es importante distinguir entre estas posibilidades, porque varias terapias propuestas están dirigidas a bloquear la formación de los agregados, lo cual de hecho podría ser más perjudicial para el paciente.

Las enfermedades por repeticiones de trinucleótidos de tipo II difieren de las afecciones de tipo I en distintos aspectos. De ellas puede decirse lo siguiente: a) se deben a la expansión de una variedad de trinucleótidos, no sólo CAG, b) los trinucleótidos participantes se hallan en una parte del gen que no codifica aminoácidos (fig. 1), c) los trinucleótidos están sujetos a expansión masiva dentro de miles de repeticiones y d) afectan numerosas partes del cuerpo, no sólo el cerebro. La anomalía de tipo II mejor estudiada es el síndrome de X frágil, así conocido porque el cromosoma mutante X es en especial susceptible al daño. El síndrome del cromosoma X frágil se caracteriza por retraso mental y diferentes anormalidades físicas. El trastorno es consecutivo a una mutación dinámica en un gen conocido como *FMR1*; éste codifica a una proteína unida al parecer a ciertos mRNA que intervienen en el desarrollo neuronal o la función sináptica. Un alelo normal de este gen contiene cinco a 55 copias de un trinucleótido específico (CGG) que está repetido en una parte del gen y corresponde a la región no codificante 5′ del RNA mensajero (fig. 1; véase también sección 12.6). Sin embargo, una vez que el número de copias rebasa las 60, el locus se torna muy inestable y el número de copias tiende a incrementarse con

rapidez hasta miles de ellas. Las mujeres con un *FMR1* de 60 a 200 copias del triplete presentan casi siempre fenotipo normal, pero son portadoras para la transmisión de un cromosoma muy inestable a su descendencia. Si el número de repeticiones en la descendencia rebasa las 200, los individuos suelen desarrollar retraso mental. A diferencia del alelo normal de la HD, que provoca enfermedad como resultado de una ganancia de función, un alelo *FMR1* anormal ocasiona afectación como efecto de una pérdida de función; los alelos *FMR1* contienen un número aumentado de repeticiones CGG que se inactivan de manera selectiva, de tal modo que el gen no se transcribe o traduce. Aunque no existe tratamiento efectivo para ninguna de las enfermedades secundarias a expansión de trinucleótidos, el riesgo de transmitir o poseer un alelo mutante puede demostrarse mediante un escrutinio genético.



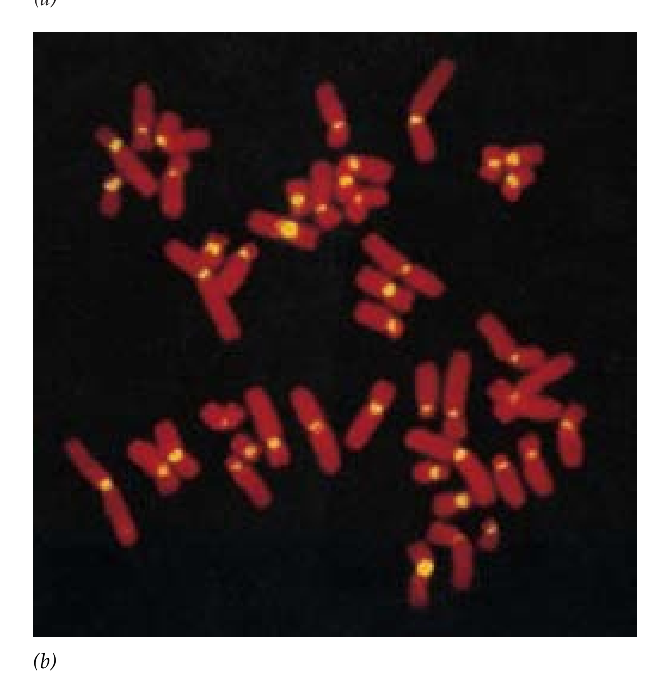


FIGURA 10-19 Hibridación in situ y localización de DNA satélite. *a*) Pasos para llevar a cabo la hibridación in situ por medio de fluorescencia. En esta técnica, se marca la sonda de DNA sin emplear isótopos radiactivos; de hecho, algunos de los nucleótidos en el DNA están unidos de forma covalente a una pequeña molécula orgánica, por lo regular biotina. Después de la hibridación, la localización del DNA marcado con biotina unido puede visualizarse al tratar la preparación con avidina fluorescente, una proteína que se une a la biotina con una gran afinidad. Los cromosomas en estas preparaciones suelen aparecer en rojo debido a que se han contrateñido con yoduro de propidio. *b*) Localización de DNA satélite alfa en el centrómero de los cromosomas humanos. La localización del DNA satélite marcado con biotina unido se revela por la fluorescencia amarilla, la cual contrasta con el fondo rojo de los cromosomas. La fluorescencia aparece sólo en el sitio donde está constreñido cada cromosoma, lo cual señala la localización del centrómero. (*B*, TOMADA DE HUNTINGTON F. WILLARD, TRENDS GENET. 6:414, 1990.)

Una vez que resultó evidente que los genomas eucariotas contenían grandes cantidades de copias de secuencias de DNA corto, los investigadores trataron de situar el punto en los cromosomas donde se hallan estas secuencias de DNA. Por ejemplo, ¿las secuencias de DNA satélite se agrupan en segmentos particulares de un cromosoma o están dispuestas de manera uniforme de un extremo a otro? Ya se mencionó que el descubrimiento de la renaturalización del DNA llevó al desarrollo de una extensa metodología basada en la hibridación de ácidos nucleicos (véase cap. 18). La capacidad de localizar secuencias de DNA satélite ilustra el poder de análisis de la hibridación de los ácidos nucleicos.

En los experimentos de renaturalización descritos en la página 403, las secuencias de DNA complementario se unieron una con otra mientras entraban en colisión de modo aleatorio en solución. Mary Lou Pardue y Joseph Gall de la *Yale University* desarrollaron en 1969 un protocolo experimental alternativo conocido como *hibridación* in situ que se usó de manera inicial para determinar la localización del DNA satélite. El término in situ significa "en el lugar" y se refiere al hecho de que el DNA del cromosoma se mantiene en el sitio mientras se permite que reaccione con una preparación particular de DNA marcado. En los estudios iniciales de hibridación in situ el DNA (la sonda de DNA) se marcó de forma radiactiva y se identificó por medio de autorradiografía. La resolución de la técnica se ha depurado mediante sondas de DNA (o RNA) marcadas con colorantes fluorescentes y reconocidas con un microscopio de fluorescencia (como se observa en la figura 10-19). Esta última técnica se

conoce como **hibridación in situ con fluorescencia** (**FISH**, del inglés *fluorescence in situ hibridization*) y se usa para mapear la ubicación relativa de secuencias diferentes a lo largo de secuencias únicas de DNA.

Para llevar a cabo la hibridación de ácidos nucleicos, las moléculas que interactúan deben ser de cadena sencilla. En el experimento que se muestra en la figura 10-19, los cromosomas que provienen de una célula mitótica se diseminan en una laminilla y el DNA se separa en cadena sencilla por tratamiento de los cromosomas con una alta concentración de sal, lo cual provoca que las cadenas de DNA se separen y permanezcan apartadas. Durante la hibridación, los cromosomas desnaturalizados se incuban en una solución de una secuencia de DNA satélite de cadena sencilla marcada con biotina, que se une de manera selectiva con las cadenas complementarias del DNA satélite inmovilizado situadas en los cromosomas. Tras un periodo de incubación, el DNA satélite no hibridado soluble se lava o digiere y se revelan los sitios de la unión del DNA marcado. Como se muestra en la figura 10-19, el DNA satélite se halla en las regiones centroméricas del cromosoma (véase también figura 12-22). Otros ejemplos del uso de la hibridación in situ con fluorescencia se muestran en las figuras 10-20 y 10-22.

Secuencias de DNA moderadamente repetidas La fracción moderadamente repetida del genoma de las plantas y animales puede variar desde casi 20 hasta más de 80% del DNA total, según sea el organismo. Esta fracción incluye secuencias repetidas en cualquier parte del genoma, desde unas pocas veces hasta varias decenas de miles. Dentro de la fracción de DNA moderadamente repetida se encuentran secuencias que codifican productos de genes conocidos, sea RNA o proteínas, y éstas no tienen función de codificación.

1. ***Secuencias de DNA repetidas con funciones codificantes.*** Esta fracción de DNA incluye a los genes que codifican RNA ribosomales y aquellos que codifican a un importante grupo de proteínas cromosómicas, las histonas. Las secuencias repetidas que codifican cada uno de estos productos son casi siempre idénticas y se disponen en una configuración semejante a la de tándem. Es esencial que estos genes que codifican RNA ribosomales estén presentes en números múltiples debido a que estos RNA se requieren en grandes cantidades y su síntesis no se beneficia del paso de amplificación adicional observado en los genes que codifican proteínas y en los cuales cada RNA mensajero actúa como plantilla o molde para la síntesis repetida de un polipéptido. Aun si en la producción de histonas interviene un RNA mensajero intermediario, se necesitan muchas copias de estas proteínas durante el desarrollo temprano y por tanto deben estar presentes cientos de DNA molde.
2. ***DNA repetidos sin funciones codificantes.*** La mayor parte de las fracciones de DNA moderadamente repetidas no codifica ningún tipo de producto. En lugar de ocurrir en la forma de grupos de secuencias tándem, los elementos de esas familias se dispersan a través del genoma como elementos individuales. Casi todas estas secuencias repetidas se pueden agrupar en dos clases: SINE (elementos cortos *interpuestos*, *s*hort *in*terspersed *e*lements) o LINE (elementos largos interpuestos, *l*ong *in*terspersed *e*lements). Las secuencias SINE y LINE se describen en la página 414.

Secuencias de DNA no repetidas Como lo predijo Mendel, los estudios de los patrones de herencia de las características visibles llevaron a los genetistas a concluir que cada gen estuvo presente en una copia por un solo grupo de cromosomas (haploide). Cuando un DNA eucariota desnaturalizado se renaturaliza, una fracción significativa de los fragmentos es muy lenta para encontrar a sus complementarios, tan lenta que se asume que hay una sola copia por genoma. Esta fracción muestra secuencias de DNA *no repetidas* (o *copias únicas*), entre las cuales se incluyen los genes que poseen patrones de herencia mendeliana. Debido a la existencia de una sola copia en el genoma, las secuencias no repetidas siempre se localizan sobre un sitio específico de un cromosoma en particular (fig. 10-20).

Si se considera la variedad de diferentes secuencias presentes, la fracción no repetida contiene, con mucho, una mayor cantidad de información genética. Incluidas dentro de la fracción no repetida se hallan las secuencias de DNA que codifican virtualmente todas las proteínas diferentes de las histonas. Aunque estas secuencias no están presentes en las copias múltiples, los genes que codifican polipéptidos son por lo regular miembros de una familia de genes relacionados. Esto es cierto para las globinas, actinas, miosinas, colágenas, tubulinas, integrinas y la mayor parte de otras proteínas de una célula eucariota. Una secuencia relacionada pero diferente codifica cada miembro de una familia multigénica. En la siguiente sección se revisa el origen de estas familias multigénicas.

Ahora que el genoma humano se ha secuenciado y analizado se dispone de una medida relativamente precisa de las

FIGURA 10-20 Localización cromosómica de una secuencia de DNA no repetida. Estos cromosomas mitóticos se prepararon a partir de una célula de ratón en división y se incubaron con una preparación purificada de DNA marcada con biotina que codifica a una de las proteínas de laminina nuclear (laminina B_2), que a su vez codifica un gen no repetido. La localización del DNA marcado unido aparece con puntos brillantes. El gen de laminina está presente en los homólogos del cromosoma 10. Cada cromosoma contiene dos copias del gen debido a que el DNA se replicó antes de que las células entraran en mitosis. (TOMADA DE MONIKA ZEWE ET AL., CORTESÍA DE WERNER FRANKE, EUR J CELL BIOL 56:349, 1991.)

secuencias de DNA que codifican las secuencias de aminoácidos de las proteínas; y, en verdad, es muy pequeña. Un genetista de 1960 habría considerado ridículo que menos de 1.5% del genoma humano codifica a los aminoácidos de las proteínas. Esta confirmación ha procedido del estudio de las secuencias del genoma. En la siguiente sección se intenta comprender mejor cómo pudieron haber surgido por evolución el restante 98% o más de las secuencias del DNA.

REVISIÓN

1. ¿Qué es un genoma?, ¿cómo difiere la complejidad del genoma bacteriano respecto de los genomas eucariotas?
2. ¿Qué significa el concepto desnaturalización del DNA?, ¿de qué manera la desnaturalización depende del contenido de GC en el DNA?, ¿cómo afecta esta variable la T_m?
3. ¿Qué es una secuencia de DNA microsatélite?, ¿qué papel juegan estas secuencias en la enfermedad humana?
4. ¿Cuál es la fracción del genoma que contiene la mayor información?, ¿por qué es verdad esto?

10.5 LA ESTABILIDAD DEL GENOMA

Debido a que el DNA es el material genético, hay cierta propensión a imaginarlo como una molécula de almacenamiento de contenido de información que cambia lentamente durante largos periodos en la evolución. Sin embargo, los estudios indican que la organización de la secuencia del genoma es capaz de sufrir un rápido cambio, no sólo de una generación a la siguiente, sino también dentro de la vida misma de un organismo individual.

Duplicación completa del genoma (poliploidización)

Como se mencionó en la primera sección de este capítulo, los guisantes y las moscas de la fruta poseen pares de cromosomas homólogos en cada una de sus células. Se dice que estas células tienen un número **diploide** de cromosomas. Si se compara el número de cromosomas presentes en las células de organismos muy vinculados, en especial plantas relacionadas, se advierte que unas especies tienen muchos más cromosomas que las especies más cercanas. Entre los animales, el anfibio más estudiado es *Xenopus laevis*, que tiene dos veces el número de cromosomas en comparación con su primo *X. tropicalis.* Estos tipos de discrepancias pueden explicarse por un proceso conocido como **duplicación completa del genoma** o **poliploidización**. La poliploidización es un suceso en el cual se produce una descendencia que tiene dos veces el número de cromosomas en cada célula que sus padres diploides; la descendencia tiene cuatro homólogos de cada cromosoma en lugar de dos. Al parecer este proceso ocurre en dos de las siguientes formas: dos especies vinculadas se cruzan para formar un organismo híbrido que contiene los cromosomas combinados de ambos padres o, de manera alternativa, un solo embrión unicelular sufre duplicación cromosómica, pero los que se duplicaron no se separan en células aisladas, sino que se retienen en una sola célula que se desarrolla en un embrión viable. El primer mecanismo tiene lugar más a menudo en plantas, aunque el segundo también se observa con frecuencia en animales.

Una duplicación "repentina" del número de cromosomas es un suceso de enorme relevancia y confiere al organismo un potencial evolutivo considerable (se asume que el organismo puede sobrevivir con el número incrementado de cromosomas y reproducirse). Según sean las circunstancias, la poliploidización puede llevar a la producción de nuevas especies que tienen mucha información genética "adicional". Hay varios hechos diferentes que pueden dar lugar a un número aumentado de copias del gen; tales factores pueden eliminarse por deleción y crear con ello mutaciones de inactivación por deleción o, lo que es más importante, pueden evolucionar como genes nuevos que poseen funciones diversas. Visto de esa forma, la información genética adicional es la materia prima para la diversificación evolutiva. En 1971, Susumu Ohno del *City of Hope Cancer Center* en Los Ángeles publicó la hipótesis de las "2R", en la cual se propuso que la evolución de los vertebrados desde un ancestro invertebrado mucho más simple fue posible por dos ciclos separados de duplicación completa del genoma durante un periodo evolutivo temprano. Ohno sugirió que los miles de genes adicionales que podrían generarse por la duplicación genómica pudieron moldearse a través del tiempo en genes nuevos que se requirieron para codificar el cuerpo más complejo de un vertebrado. En las pasadas tres y media décadas, los genetistas han debatido de modo acalorado la propuesta de Ohno y tratado de encontrar evidencia que apoye o refute esta noción.

El problema que se opone al análisis del genoma es la gran cantidad de tiempo que ha pasado (varios cientos de millones de años) desde el origen de los ancestros vertebrados más tempranos. Del mismo modo que los ríos o los océanos cubrieron lentamente la faz de la Tierra, las mutaciones cubrieron con suma lentitud el aspecto de un genoma ancestral. A pesar de contar con la secuencia completa del genoma humano, es aún un reto formidable identificar el origen de muchos de los genes. La mejor evidencia de que sucedió la poliploidización durante la evolución temprana de vertebrados procede de los análisis de los segmentos o regiones contenidos en los genes *Hox*, los cuales desempeñan un papel importante en el desarrollo de la estructura básica del cuerpo del animal (esto se analiza en la sección Vías experimentales del capítulo 12 y puede encontrarse en Internet). Los invertebrados examinados tienen un solo grupo de genes *Hox*, pero los vertebrados poseen cuatro de esas regiones, un hallazgo que apoya la hipótesis de Ohno acerca de dos ciclos de duplicación del genoma ancestral.

Duplicación y modificación de secuencias del DNA

La poliploidización es un caso extremo de duplicación génica y ocurre sólo rara vez durante la evolución. En cambio, la **duplicación génica**, que se refiere a la duplicación de una pequeña porción de un solo cromosoma, sucede con una frecuencia sor-

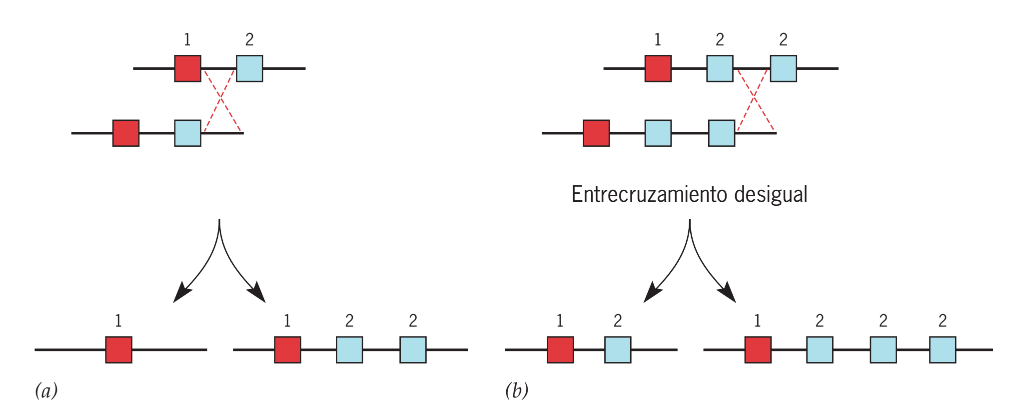


FIGURA 10-21 El entrecruzamiento desigual entre los genes duplicados suministra un mecanismo para generar cambios en el número de genes. *a*) El estado inicial mostrado tiene dos genes relacionados (1 y 2). En un individuo diploide, el gen 1 sobre un homólogo se puede alinear con el gen 2 del otro homólogo durante la meiosis. Si el entrecruzamiento ocurre durante esta mala alineación, la mitad de los gametos pierde un gen 2 y la otra adquiere un gen 2 adicional. *b*) Conforme el entrecruzamiento desigual continúa durante las divisiones meióticas en generaciones subsecuentes, evoluciona de modo gradual una secuencia de ordenamientos de DNA repetidos en tándem.

prendentemente alta y su ocurrencia se documenta por medio del análisis genómico.[3] De acuerdo con un cálculo reciente, cada gen del genoma tiene alrededor de 1% de probabilidades de duplicarse cada millón de años. Es posible que la duplicación de un gen ocurra por varios mecanismos diferentes, pero más a menudo por un proceso de *entrecruzamiento desigual*, como se describe en la figura 10-21. El entrecruzamiento desigual se observa cuando un par de cromosomas homólogos queda junto durante la meiosis, de tal forma que no se une por completo. Como resultado de esta mala unión, el intercambio genético entre los homólogos da lugar a que un cromosoma adquiera un segmento adicional de DNA (una duplicación) y el otro cromosoma lo pierda (una deleción). Si la duplicación de una secuencia particular se repite en las subsecuentes generaciones, se crea un grupo de segmentos repetidos en tándem y se localiza dentro de ese cromosoma (fig. 10-22).

La gran mayoría de los genes duplicados se pierde durante la evolución por deleción o genera genes no funcionales por mutaciones desfavorables, aunque un pequeño porcentaje adquiere mutaciones favorables que permiten que la copia "adicional" adquiera una nueva función. De manera alternativa, las dos copias del gen pueden sufrir mutaciones, así que cada una evoluciona hacia una función más especializada que la que realizaba el gen original. En cualquier caso, los dos genes poseen secuencias muy relacionadas y codifican polipéptidos muy semejantes, de tal forma que es posible afirmar que codifican diferentes isoformas de una proteína particular, como las tubulinas alfa y beta (pág. 334). Las duplicaciones subsecuentes de uno de los genes pueden inducir la aparición de isoformas adicionales (p. ej., tubulina gamma), y así sucesivamente. En este ejemplo resulta patente que las duplicaciones sucesivas de un gen pueden generar familias de genes que codifican polipéptidos con secuencias de aminoácidos relacionados. La evolución de los genes de globina ilustra la producción de una familia multigénica.

FIGURA 10-22 Localización de una región en cromosomas humanos que contienen un gen recién duplicado. La imagen muestra la hibridación in situ con fluorescencia, mediante cromosomas humanos incubados con DNA marcado con biotina, de un gen que provoca la enfermedad de los riñones poliquísticos. La flecha indica una región del cromosoma 16 que contiene varias copias del DNA marcado y enlazado. Un análisis posterior indicó la presencia en esa región de tres genes (*HG-A*, *HG-B* y *HG-C*), cuya secuencia de nucleótidos es lo bastante parecida para enlazarse a la misma sonda de DNA marcada. El hecho de que las secuencias no difieran en grado notorio señala que su duplicación ocurrió en ancestros recientes (Tomada de Christopher J. Ward et al., Cell 77:883, 1994; cortesía de Peter C. Harris, con autorización de Cell Press.)

[3] En la actualidad existen tres categorías de duplicación que pueden establecerse como sigue: genoma completo, gen y duplicación de segmentos. Este último, que se refiere a la duplicación de un gran bloque de material cromosómico (de unas cuantas kilobases a cientos de kilobases de longitud) no se discute aquí, pero tiene un efecto significativo en el genoma. Alrededor de 5% del genoma humano presente consiste en duplicaciones de segmentos que han evolucionado durante los pasados 35 millones de años.

Evolución de los genes de globina La hemoglobina es un tetrámero compuesto de cuatro polipéptidos de globina (véase fig. 2-38*b*). El examen de los genes de globina, de mamíferos o peces, revela una organización muy característica. Cada uno de estos genes está formado por tres exones y dos intrones. Los exones son la parte de los genes que codifica aminoácidos en el polipéptido codificado, en tanto que los intrones no lo son, más bien son secuencias interpuestas no codificantes. El significado de los exones e intrones se analiza con detalle en la sección 11.4 (véase fig. 11-24). Para las explicaciones de este capítulo se utilizan estas partes de los genes como marcas de la evolución. El examen de los genes que codifican a ciertos polipéptidos semejantes a la globina, por ejemplo la proteína leghemoglobina de las plantas y la mioglobina como proteína muscular, revelan la presencia de cuatro exones y tres intrones. Se ha propuesto que representan la forma ancestral del gen de la globina. Se cree que el polipéptido de globina actual se originó de una forma ancestral como resultado de la fusión de dos exones de globina (paso 1, fig. 10-23) hace unos 800 millones de años.

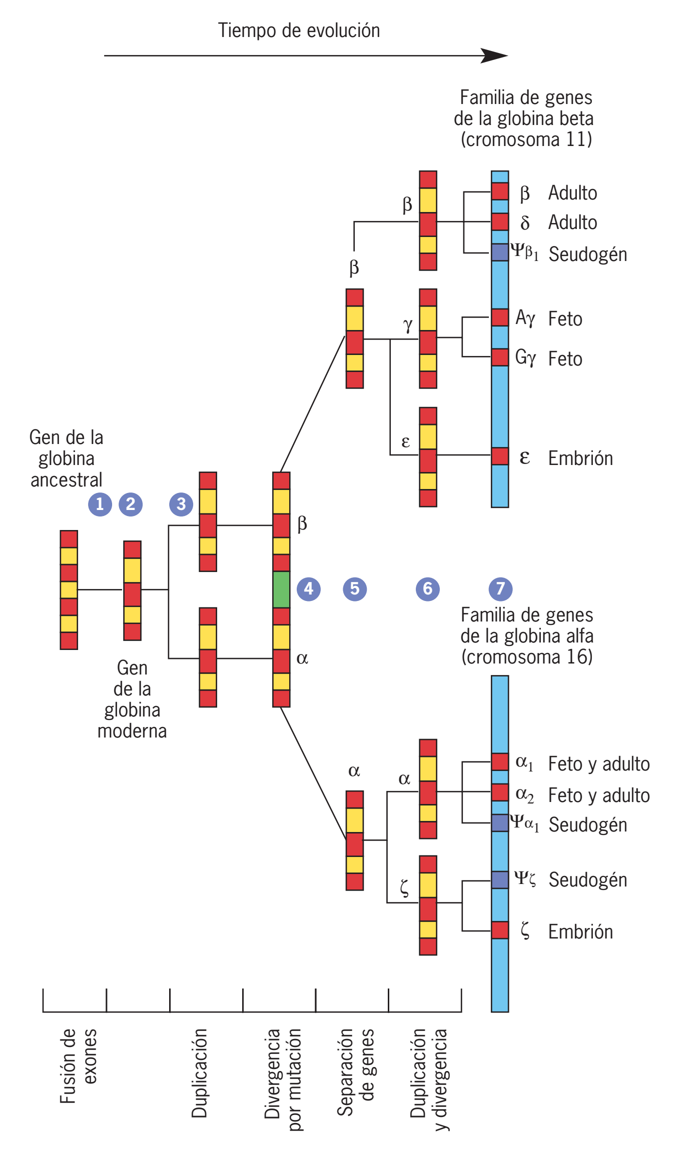


FIGURA 10-23 Una vía para la evolución de los genes de la globina. Los exones se muestran en rojo y los intrones en amarillo. Los pasos evolutivos se señalan en el diagrama y se analizan en el texto. Los ordenamientos de los genes de las globinas alfa y beta de los cromosomas humanos 16 y 11 (mostrados sin sus intrones a la derecha) son los productos de varios cientos de millones de años de evolución. Como se discute en el capítulo 2, la molécula de hemoglobina posee dos pares de cadenas polipeptídicas, un par es siempre un miembro de una subfamilia de la globina alfa y el otro par es siempre un miembro de una subfamilia de la globina beta. Las combinaciones específicas de globinas alfa y beta se hallan en diferentes estados del desarrollo. Las cadenas de las globinas alfa y beta observadas en las hemoglobinas de fetos, embriones y adultos se indican en la figura.

Se sabe que algunos peces primitivos tienen sólo un gen de globina (paso 2), lo que sugiere que estos peces se separaron de otros vertebrados después de la primera duplicación del gen de globina (paso 3). Tras esta duplicación hace unos 500 millones de años, las dos copias divergieron por mutación (paso 4) para formar dos tipos distintos de globina, una alfa y una beta, localizados en un solo cromosoma. Este es el ordenamiento presente en el anfibio *Xenopus* y el pez cebra. En pasos subsecuentes, las formas alfa y beta se separaron la una de la otra por un proceso de reordenamiento que dio lugar a cromosomas separados (paso 5). En consecuencia, cada gen sufrió subsecuentes duplicaciones y divergencias (paso 6) y ello propició los ordenamientos génicos de globina que existen en la actualidad en los seres humanos (paso 7). La evolución de los genes de la globina de los vertebrados ilustra el modo en que la duplicación génica suele llevar a la generación de una familia génica cuyos miembros individuales tienen funciones especializadas (en este caso formas embrionaria, fetal y adulta) en comparación con el gen fundador individual.

Cuando se analizaron las secuencias de DNA de los grupos del gen de la globina, los investigadores encontraron "genes" cuyas secuencias son homólogas respecto de los genes funcionales de globina, pero éstos han acumulado mutaciones profundas que los han tornado no funcionales. Los genes de este tipo, que son reliquias evolutivas, se conocen como **seudogenes**. Ejemplos de éstos se hallan en los grupos génicos de las globinas humanas alfa y beta de la figura 10-23. Otro punto importante del examen de los dos grupos de genes de la globina de los cromosomas humanos es la cantidad de DNA integrado por secuencias no codificantes, sea como intrones o como secuencias espaciadoras dentro de los genes. De hecho, las regiones de globina contienen una fracción mucho más alta de secuencias codificantes que la mayor parte de otras regiones del genoma.

"Genes saltarines" y la naturaleza dinámica del genoma

Si se observan las secuencias repetidas que han surgido durante el curso normal de la evolución, se advierte que algunas veces están presentes en ordenamientos en tándem, en ocasiones en dos o unos cuantos cromosomas (como en el caso de los genes de la globina de la figura 10-23) y en otras veces dispersos a través del genoma. Si se asume que todos los miembros de una familia de secuencias repetidas provienen de una sola copia, entonces ¿cómo pudieron los miembros individuales dispersarse a través de distintos cromosomas?

Barbara McClintock, una genetista que realizaba investigaciones con el maíz en los *Cold Spring Harbor Laboratories* de

FIGURA 10-24 Manifestaciones visibles de la transposición en el maíz. De manera característica, los granos de maíz tienen un color uniforme. Los puntos de este grano son resultado de la mutación de un gen que codifica una enzima, sobre todo en la producción de pigmentos. Las mutaciones de este tipo deben ser muy inestables y se originan o desaparecen durante el periodo de desarrollo de un solo grano. Estas mutaciones inestables aparecen y desaparecen como consecuencia del movimiento de elementos susceptibles de mudarse durante el periodo de desarrollo. (Cortesía de Venkatesan Sundaresan, Cold Spring Harbor Laboratory.)

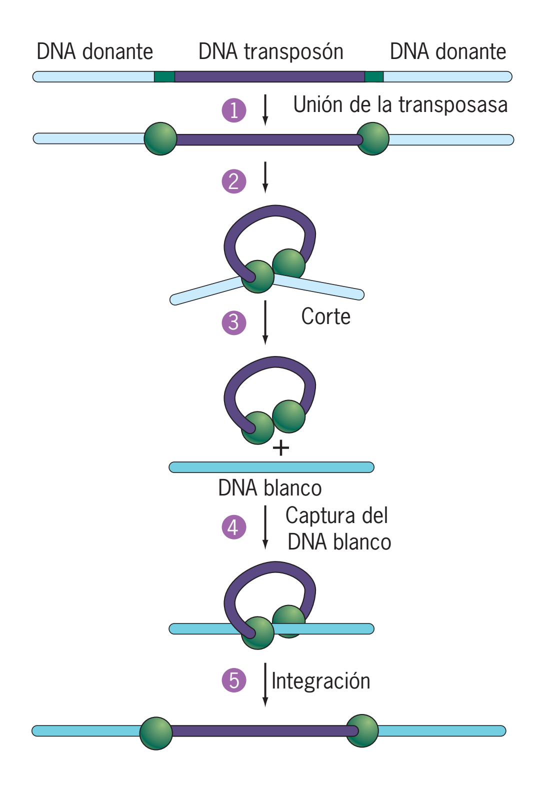


FIGURA 10-25 Transposición de un transposón bacteriano por un mecanismo de "corte y pegado". Como se describe en el texto, los dos extremos de este transposón bacteriano Tn5 se transfieren juntos y se pegan por dimerización de un par de subunidades de la transposasa. Ambas cadenas de la doble hélice se cortan en cada extremo, lo cual escinde al transposón como parte del complejo con una transposasa. Un DNA blanco "captura" al complejo transposón-transposasa y el transposón se inserta en esta vía para producir una pequeña duplicación que flanquea el elemento transpuesto. (Nota: no todos los transposones de DNA se mueven por este mecanismo.) (A partir de D. R. Davies et al., Science 289:77, 2000; © 2000 American Association for the Advancement of Science.)

Nueva York, fue la primera en sugerir que los elementos genéticos eran capaces de moverse a través del genoma. Las características genéticas del maíz se expresan en la forma de cambios en los patrones, marcas en las hojas y coloración de las mazorcas (fig. 10-24). Al final de la década de 1940, McClintock encontró que ciertas mutaciones eran muy inestables, aparecían y desaparecían de una generación a la siguiente o asimismo durante la vida de una planta individual. Después de varios años de cuidadoso estudio, concluyó que ciertos elementos genéticos experimentaron movimiento de un lugar en un cromosoma a un sitio por entero diferente. Esta científica nombró a estas reconfiguraciones genéticas **transposiciones** y a las entidades genéticas móviles **elementos transponibles**. Entre tanto, los biólogos moleculares que trabajaban con bacterias no encontraron evidencia de estos "genes saltarines". En sus estudios, los genes aparecían como elementos estables situados en una configuración lineal en el cromosoma que permanecía constante de un individuo a otro y de una generación a la siguiente. El hallazgo de McClintock se ignoró por mucho tiempo.

Entonces, a finales de la década de 1960 diferentes laboratorios descubrieron que ciertas secuencias de DNA en las bacterias se movían de un lugar a otro en el genoma. A estos elementos transponibles se los llamó **transposones**. La mayoría de los transposones codifican una proteína, o *transposasa*, que cataliza la escisión de un transposón a partir del sitio donante de DNA y su posterior introducción al sitio específico del DNA. Dos subunidades de transposasa separadas, que se unen a secuencias específicas en los dos extremos del transposón, median este mecanismo de "corte y pegado" (fig. 10-25, paso 1). Las dos subunidades se unen entonces para formar un dímero activo (paso 2) que cataliza una serie de reacciones que llevan a la escisión del transposón (paso 3). A continuación, el complejo transposasa-transposón se une a un DNA blanco (paso 4) y la transposasa cataliza las reacciones requeridas para integrar al transposón en este nuevo lugar de residencia (paso 5).

El análisis de la secuencia de la mayoría de los transposones indica que la secuencia presente en un extremo del elemento se repite en el extremo opuesto, pero en una orientación contraria (p. ej., como una repetición invertida) (segmentos en rojo de la figura 10-26). Las transposasas reconocen estas repeticiones terminales, que se necesitan para la transposición. Además, la integración de los elementos crea una pequeña duplicación en el DNA blanco que flanquea a los elementos transpuestos en el sitio de inserción (segmentos verdes en la figura 10-26). Las duplicaciones en los sitios blanco sirven como "huellas" para identificar los sitios en el genoma que ocupan los elementos transponibles.

Como lo demostró primero McClintock, los genomas eucariotas contienen gran número de elementos transponibles. ¡De hecho, *al menos* 45% del DNA en el núcleo de una célula humana procede de elementos transponibles! La gran mayoría (> 99%) de los elementos transponibles es incapaz de moverse de un lugar a otro; en realidad, están encriptados por mutación o la misma célula anula su movimiento. Sin embargo, cuando

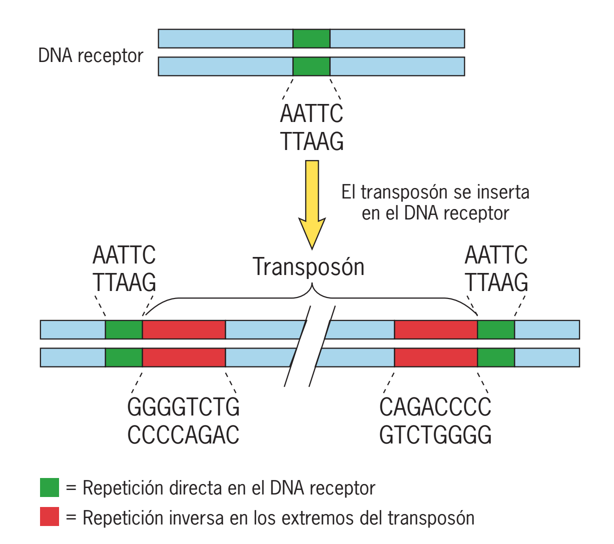


FIGURA 10-26 Organización de la secuencia de un transposón típico. Los extremos del elemento móvil transponible contienen una secuencia (rojo) repetida de manera inversa. La integración del transposón al DNA del huésped crea una duplicación que se observa como una unidad corta, directa y repetida (verde) en ambos extremos del elemento. Las secuencias de nucleótidos mostradas pertenecen al Tn3, un transposón bacteriano que codifica tres proteínas, incluida la transposasa que le permite integrarse a nuevos sitios en el DNA.

los elementos transponibles cambian de posición, se insertan a través del DNA blanco. En realidad, muchos elementos transponibles pueden insertarse ellos mismos en el centro de un gen que codifica a alguna proteína. Se han comentado muchos ejemplos de lo anterior en seres humanos, incluido un número de casos de hemofilia secundaria a elementos genéticos móviles que han "brincado" en el medio de uno de los genes que codifican a proteínas de la coagulación. Se estima que alrededor de una de 500 mutaciones que causan enfermedad es consecuencia de la inserción de un elemento transponible.

La figura 10-27 representa dos principales tipos de elementos eucariotas transponibles, los transposones de DNA y los retrotransposones, y sus mecanismos diferentes de transposición. Los transposones de DNA, como se describió antes para los procariotas, se escinden del DNA en el sitio donante e insertan en un blanco distante (fig. 10-27*a*). Este mecanismo de "corte y pegado" lo utilizan, por ejemplo, los miembros de los elementos transponibles de la familia *mariner*, que se hallan en los reinos de las plantas y los animales. En cambio, los **retrotransposones** operan por mecanismos de "copia y pegado" en los que interviene un RNA intermedio (fig. 10-27*b*). Se transcribe el DNA del elemento transponible y produce un RNA, que entonces lo "retrotranscribe" una enzima conocida como **transcriptasa inversa** para crear un DNA complementario. La copia de DNA se elabora con doble cadena y entonces se integra en un sitio blanco del DNA. En la mayoría de los casos, el retrotransposón contiene por sí mismo la secuencia que codifica a la transcriptasa inversa. Los retrovirus, como el virus del sida, usan un mecanismo muy similar para replicar sus genomas e integrarse como una copia del DNA en el cromosoma del hospedador. Al parecer, los retrovirus han evolucionado a partir de los retrotransposones tras adquirir genes que permiten a éstos abandonar la célula y ser infecciosos (p. ej., genes que codifican proteínas de envoltura).

El papel de los elementos genéticos móviles en la evolución Como se mencionó en la página 408, las secuencias de DNA moderadamente repetidas constituyen una porción

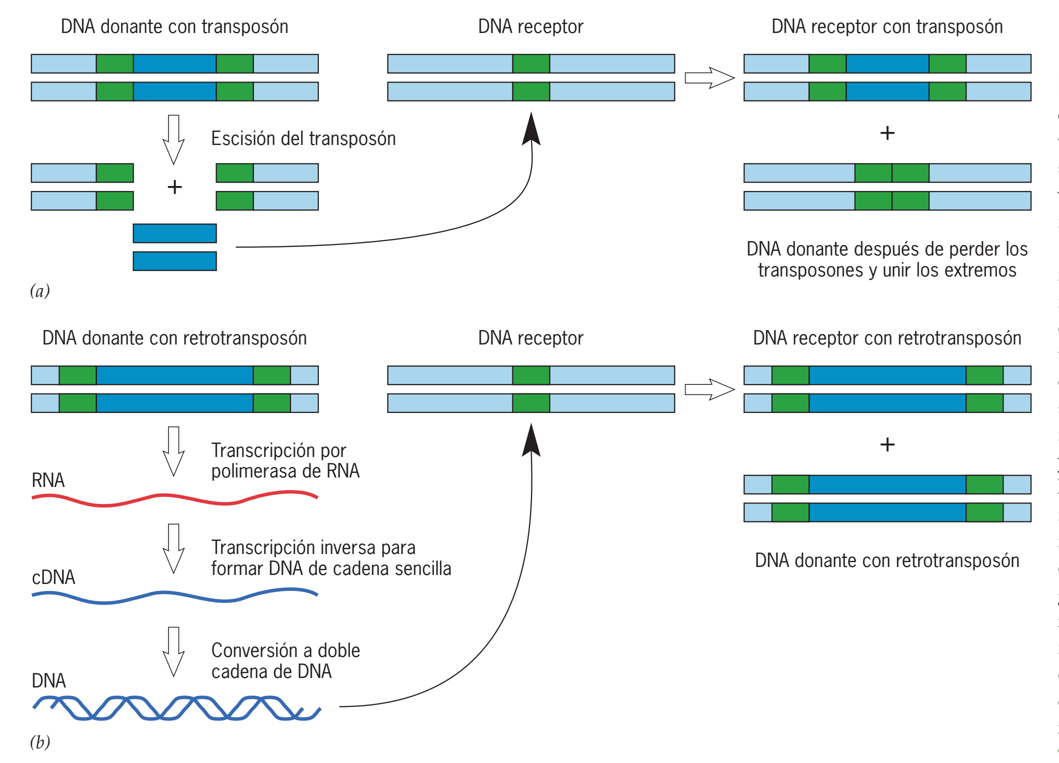


FIGURA 10-27 Vías esquemáticas en el movimiento de los elementos transponibles. *a*) Los transposones de DNA se mueven por la vía de corte y pegado, cuyo mecanismo se demuestra en la figura 10-25. Alrededor de 3% del genoma humano consiste en transposones de DNA, ninguno de los cuales es capaz de transposición (es decir, todos son reliquias del genoma como resultado de la actividad ancestral). *b*) Los retrotransposones se mueven por una vía de corte y pegado. Los pasos incluidos en la retrotransposición suceden en el núcleo y el citoplasma y requieren numerosas proteínas, incluidas las del hospedador. Más de 40% del genoma humano se integra con retrotransposones, pero sólo algunos de éstos (p. ej., 40 a 100) son capaces quizá de transposición. Se conoce más de un mecanismo de retrotransposición.

significativa del genoma humano. A diferencia de la fracción altamente repetida del genoma (DNA satélite, minisatélite y microsatélite), cuyas secuencias residen en tándem y se generan por duplicación de DNA, la mayor parte de las secuencias moderadamente repetidas del genoma está diseminada y se genera por transposición de elementos genéticos móviles. De hecho, las dos familias más comunes de secuencias moderadamente repetidas en el DNA humano son elementos transponibles: las familias *Alu* y L1. Tal y como se describió en la página 408, hay dos clases de elementos diseminados, SINE y LINE. Los *Alu* son un ejemplo de los primeros y los L1 de los segundos. Una secuencia transponible L1 completa (por lo menos 6 000 pares de bases de longitud) codifica una proteína única con dos actividades catalíticas: una transcriptasa inversa que elabora una copia de DNA a partir del RNA que lo codifica y una endonucleasa que indenta el DNA blanco antes de la inserción. Se estima que el genoma humano contiene unas 500 000 copias de L1, pero la gran mayoría son elementos inmóviles incompletos. Se estima también que alrededor de 2% de los seres humanos posee un nuevo inserto genómico L1, es decir, un elemento L1 que no estaba presente en el genoma de ninguno de los progenitores.

Aún más abundantes que las secuencias L1 son las *Alu*, interpuestas o diseminadas en más de un millón de diferentes sitios a lo largo del genoma humano. Las *Alu* son una familia de secuencias cortas y relacionadas y poseen casi 300 pares de bases de longitud. Las secuencias *Alu* son muy similares a las pequeñas RNA presentes en la señal de partículas de reconocimiento de señales encontradas en unión con los ribosomas unidos a membrana (pág. 286). Se presupone que durante el curso de la evolución, este RNA citoplásmico se copió en una secuencia de DNA por mediación de la transcriptasa inversa y se integró dentro del genoma. La impresionante amplificación de las secuencias *Alu* ha ocurrido quizá por retrotransposición a través de una transcriptasa inversa y la endonucleasa codificada por las secuencias L1.

En virtud de esta prevalencia en el genoma humano, podría esperarse que la secuencia *Alu* estuviera repetida a través de los genomas del resto del reino animal, pero no es así. Estudios genómicos comparativos indican que las secuencias *Alu* aparecieron primero como elementos transponibles en el genoma de los grandes primates hace unos 60 millones de años y el número de copias creció a partir de entonces. La frecuencia de transposición de los elementos *Alu* se ha incrementado de forma notoria en el curso de la evolución de los primates y se estima hoy día que en los seres humanos se aproxima a una por cada 200 nacimientos.

Cuando se descubre algo nuevo semejante a los elementos transponibles en un organismo, la primera pregunta de los biólogos es casi siempre: ¿cuál es su función? Muchos investigadores que estudian la transposición piensan que los elementos transponibles son de manera primaria "basura". De acuerdo con esta visión, un elemento transponible es un tipo de parásito genético que puede invadir el genoma de un hospedador a partir del mundo externo, diseminarse dentro de él y transmitirse a su descendencia (siempre y cuando no tenga efectos adversos y serios en la capacidad del hospedador para sobrevivir y reproducirse). Si éste es el caso, ello no significa que los elementos transponibles no puedan hacer contribuciones positivas a los genomas eucariotas. A pesar de tal origen, una vez que una secuencia de DNA se halla en el genoma, éste es *susceptible* de "utilizarse" para algún beneficio durante el curso de la evolución. Por esa razón, dicha porción del genoma se ha denominado "depósito de material genético". Existen diferentes mecanismos posibles por los cuales los elementos transponibles pudieron intervenir en la evolución adaptativa:

1. En ocasiones, los elementos transponibles pueden llevar con ellos partes adyacentes del genoma del hospedador cuando se mueven de un sitio a otro. En teoría, dos segmentos no unidos del genoma del hospedador pueden conectarse para formar uno nuevo: un segmento compuesto. Éste puede ser un mecanismo primario en la evolución de proteínas compuestas por dominios derivados de diferentes genes ancestrales (véase fig. 2-36).
2. Las secuencias de DNA que derivaron de modo original de los elementos transponibles se encuentran como partes de genes eucariotas, además de los segmentos de DNA que regulan la expresión génica. De acuerdo con un estudio reciente, las *regiones codificantes* de cerca de 1.3% del genoma humano contienen recuadros que se derivan de elementos *Alu*.[4] Las secuencias *Alu* sólo se hallan en genomas de primates, lo cual indica que estos genes que contienen *Alu* se han modificado de manera sustancial por transposición en los pasados 60 millones de años. Tales hallazgos revelan la importancia de la transposición en la evolución y especies divergentes.
3. En algunos casos, los elementos transponibles parecen dar lugar a genes ellos mismos. La enzima telomerasa, que desempeña una función clave en la replicación del DNA en los extremos terminales del cromosoma (véase fig. 12-20) pudieron originarse en una transcriptasa inversa codificada por un retrotransposón antiguo. Las enzimas participantes en los reordenamientos de los genes de los anticuerpos (véase fig. 17-16) se derivaron de una transposasa codificada por un transposón antiguo de DNA. Si así fuera, la capacidad para protegerse de las enfermedades infecciosas es una consecuencia directa de la transposición.

Un punto es claro: la transposición ha tenido un profundo efecto en la composición genética de los organismos. Resulta interesante observar que, hace apenas un par de décadas, los biólogos consideraban que el genoma era un depósito estable de información genética. En la actualidad resulta notable que los organismos puedan conservar su propia integridad de un día para otro a la luz de esta reconfiguración a gran escala por reordenamiento genético. Por su descubrimiento de la transposición, Barbara McClintock fue la única que recibió el premio Nobel en 1983, a la edad de 81 años, unos 35 años después de su hallazgo inicial.

REVISIÓN ?

1. Describa el curso de los sucesos evolutivos que han dado lugar a las familias de múltiples genes, como los que codifican a las globinas. ¿Cómo pudieron estos

[4] Estos elementos *Alu* aparecen casi de forma exclusiva en exones que pueden de manera alternativa procesarse, lo cual significa que la célula es capaz de producir dos versiones de la proteína, una que contiene la secuencia codificante de *Alu* y una que carece de ella. Tal vez la presencia de elementos transponibles promueve la formación de variaciones alternativas de una proteína.

sucesos originar a los seudogenes?, ¿cómo crearían proteínas con funciones del todo diferentes?

2. Describa dos mecanismos por medio de los cuales los elementos genéticos son capaces de moverse de un sitio del genoma a otro.
3. Describa los efectos que han tenido los elementos transponibles en la estructura del genoma humano en los pasados 50 millones de años.

10.6 SECUENCIACIÓN DE GENOMAS: LA BASE GENÉTICA DEL SER HUMANO

Determinar la secuencia nucleotídica de todo el DNA de un genoma es una tarea formidable. Durante las décadas de 1980 y 1990, la tecnología que acompañó este esfuerzo mejoró de forma gradual conforme los investigadores desarrollaron nuevos vectores para clonar grandes segmentos de DNA e incrementaron los procedimientos automatizados para determinar las secuencias nucleotídicas de estos grandes fragmentos (se discute en la sección 18.15). La primera secuencia completa de un organismo procariota se notificó en 1995 y la primera secuencia completa de un organismo eucariótico, la levadura que produce gemación, *S. cerevisiae*, se informó un año después. Unos pocos años después (mientras la comunidad científica aguardaba los resultados de la investigación del genoma humano) se informaron las secuencias genómicas de numerosos organismos procariotas y eucariotas (incluidos la mosca de la fruta, un nematodo y una angiosperma). Los investigadores pudieron determinar la secuencia de estos genomas con relativa rapidez porque son considerablemente más pequeños que el genoma humano, el cual contiene alrededor de 3 200 millones de pares de bases. Para tratar de concebir este número considérese que si cada par de bases del DNA fuera equivalente a una sola letra de esta página, la información contenida en el genoma humano se extendería en un libro de un millón de páginas.

Para el año 2001 se había publicado ya un primer informe de la secuencia nucleotídica de todo el genoma humano. La secuencia se describió como una "aproximación" debido a que cada segmento se secuenció un promedio de cuatro veces, lo cual no es suficiente para una perfección absoluta y muchas regiones que resultaron difíciles de secuenciar se excluyeron. Los primeros intentos para *describir* la secuencia genómica, esto es, interpretar la secuencia en términos del número y tipo de genes codificantes, llevó a una sorprendente observación en relación con el número de genes. Los investigadores concluyeron que el genoma humano contenía tal vez unos 30 000 genes que codifican proteínas. Mientras no se determinó su secuencia completa, se supuso que el genoma humano contenía cuando menos 50 000 y quizá hasta 150 000 genes diferentes.

La versión "terminada" de la secuencia del genoma humano se informó en 2004, luego de que a) cada sitio se secuenció de siete a 10 veces para asegurar un alto grado de exactitud (al menos de 99.99%), y b) la secuencia contenía un número mínimo de huecos. Los huecos no secuenciados que persistían contenían regiones de los cromosomas (a menudo referidas como "materia negra") que poseen gran cantidad de secuencias de DNA muy repetidas, sobre todo alrededor de los centrómeros de cada cromosoma. A pesar de los exhaustivos esfuerzos, estas regiones han opuesto dificultades para clonarse o secuenciarse con la tecnología de ese momento.

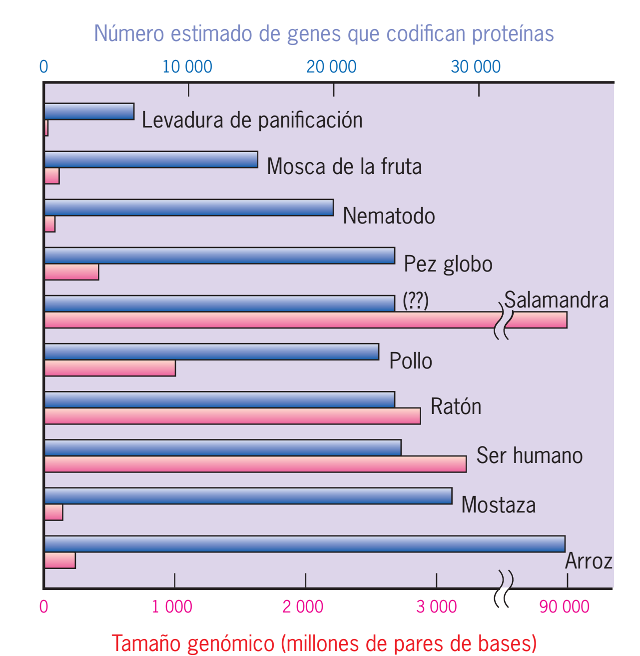


FIGURA 10-28 Comparaciones de genomas. Entre los eucariotas cuyos genomas se han secuenciado, el número de genes codificadores de proteína varía de unos 6 200 en levadura a 37 000 en el arroz; se piensa que los vertebrados tienen unos 25 000. Mientras que el números de genes estimados varía dentro de un intervalo modesto entre los eucariontes, la cantidad de DNA en un genoma varía ampliamente, y alcanza valores de 90 000 millones de pares de bases en algunas salamandras (se desconoce el número génico real para estos anfibios). Muchos de los organismos cuyos genomas se han secuenciado (p. ej., la mostaza *Arabidopsis* y el pez globo *Fugu*) se seleccionaron porque poseen genomas especialmente compactos.

No obstante este notable avance en la determinación de la secuencia de nucleótidos, aún hay incertidumbre acerca del número real de genes que codifican proteínas en el genoma humano. De hecho, el estimado previo de 30 000 genes codificadores de proteínas se ha actualizado a la baja; en la actualidad se estiman unos 25 000, una cifra no mucho mayor que la correspondiente a la mosca de la fruta (alrededor de 14 000 genes) o un nematodo (alrededor de 21 000 genes), y más o menos equivalente a la del ratón, la mostaza (*Arabidopsis*) y el pez globo (*Fugu*) (fig. 10-28).[5]

[5] En la figura 10-28 también puede verse que existe muy poca correlación entre el número de genes codificadores de proteína y la cantidad total de DNA en el genoma. Por ejemplo, en el pez globo, que tiene aproximadamente el mismo número de genes que otros vertebrados, el tamaño del genoma es alrededor de un octavo del propio del ser humano. En el otro extremo del espectro, el genoma de determinadas salamandras es unas 30 veces mayor que el genoma humano. El contraste en el tamaño del genoma entre los vertebrados refleja una notable diferencia en el contenido de DNA no codificador, en gran medida repetitivo. Es incierto el significado evolutivo de estas diferencias.

Si las diferencias de complejidad entre los organismos no pueden explicarse con base en el número de genes en sus genomas, ¿qué las explica? En realidad no existe una buena respuesta a esta interrogante. Hay algunos cuantos puntos por considerar. Como se describe en el capítulo 12, un gen único puede codificar diferente número de proteínas relacionadas como resultado de un proceso denominado empalme (*splicing*) alternativo (véase sección 12.5). Se estima que 60% de los genomas humanos realiza un empalme alternativo, de manera que el número actual de proteínas codificadas por el genoma humano es por lo menos varias veces más grande que el número de genes que éste contiene. Tal es la razón por la cual surgen grandes diferencias entre organismos cuando se explota este mecanismo "enriquecedor de genes". Esta expectativa resulta consistente con el hecho de que los genes humanos tienden a ser más complejos (es decir, contienen más exones) que los de moscas y gusanos y probablemente son sometidos a una mayor cantidad de modificaciones postraduccionales. Parecería que la diferencia de complejidad entre seres humanos y otros animales (en particular otros vertebrados) no se correlaciona con la cantidad de información genética heredada, sino con el destino de ella así como la forma de desarrollarla. Por ejemplo, los mecanismos que controlan la expresión genética pueden ser más complejos en personas que en otros animales, sobre todo los vinculados con el desarrollo del cerebro. Este punto lo ejemplifica con claridad el par de fotografías de la figura 2-47, en la cual aparece una muestra de las diferencias proteínicas entre el hombre y el cerebro del chimpancé. A pesar de que estas dos especies expresan genes semejantes, muchas de las proteínas codificadas por estos genes están presentes en cantidades sorprendentemente diferentes y exhiben modificaciones postraduccionales distintas. En buena medida, tales diferencias deben provenir de cambios en las secuencias no codificantes, regiones reguladoras que controlan el nivel de expresión de estos genes.

Genómica comparativa: "si está conservado, entonces debe ser importante"

Los siguientes hechos deben tomarse en cuenta: a) la mayor parte del genoma consiste en DNA localizado entre los genes y representa el DNA intergénico y b) cada uno de los alrededor de 25 000 genes que codifican proteínas posee sobre todo secuencias no codificantes (DNA intrónico). Tomados en conjunto, estos hechos indican que la porción del genoma que codifica a proteínas representa un pequeño porcentaje del DNA total (que se estima en alrededor de 1.5%). La mayor parte del DNA intergénico e intrónico del genoma no contribuye a las capacidades de supervivencia y reproductivas de un individuo, de modo que no hay una presión selectiva que mantenga su secuencia inalterada. Como resultado, la mayoría de las secuencias intergénicas e intrónicas tienden a cambiar con rapidez a medida que los organismos evolucionan. En otras palabras, estas secuencias tienden a no conservarse. En cambio, aquellos segmentos del genoma que codifican secuencias proteínicas o contienen secuencias reguladoras que controlan la expresión génica (véase fig. 12-41) están sometidos a la selección natural. Ésta tiende a eliminar a los individuos cuyo genoma contiene mutaciones en estos elementos funcionales.[6] Como resultado, estas secuencias tienden a conservarse. Se sigue de estos comentarios que la mejor manera de identificar secuencias funcionales es comparar los genomas de diferentes tipos de organismos.

A pesar de que las especies humana y del ratón no comparten un ancestro común durante aproximadamente 75 millones de años, las dos especies poseen genes similares, que se localizan en segmentos con un patrón muy semejante. Por ejemplo, el número y orden de los genes de la globina humana que se muestran en la figura 10-23 son en esencia similares a los del genoma del ratón. Como resultado, es una tarea muy simple alinear las regiones correspondientes del genoma humano y del ratón. Por ejemplo, el cromosoma humano número 12 comprende una serie de segmentos, en los cuales cada porción corresponde de manera regular a un bloque de DNA de un cromosoma de ratón. El número del cromosoma de ratón que contiene cada bloque se indica como sigue.

Cromosoma humano 12

Los estudios preliminares que derivan del alineamiento de segmentos de los genomas del ser humano y el ratón sugieren que alrededor de 5% de las secuencias de DNA está muy conservado entre las dos especies. Éste es un porcentaje considerablemente más alto del que se esperaría por la combinación de las regiones codificantes y las regiones reguladoras de genes (juntas representan 2% del genoma). Si se acepta uno de los principios más importantes de la evolución molecular: "si está conservado, entonces debe ser importante", estos estudios revelan en consecuencia que partes del genoma, que se presumía eran secuencias no codificantes ni reguladoras "inútiles", tienen en realidad una función importante, pero no definida aún. Es indudable que algunas de estas regiones codifican RNA pequeños descubiertos hace poco tiempo, pero sus funciones no se han determinado todavía (se analiza en la sección 11.5). Es probable que otras tengan "funciones cromosómicas" más que "genéticas". Por ejemplo, estas secuencias conservadas podrían ser importantes para el pareamiento cromosómico previo a la división celular. Cualquiera que sea la función, estos elementos genómicos a menudo se localizan a grandes distancias del gen más cercano e incluyen algunas de las secuencias más conservadas jamás descubiertas, con virtual identidad entre los genomas, humano y de ratón.

Al comparar regiones del genoma de dos especies relacionadas de manera distante, como las del ser humano y del ratón,

[6] Es posible reconocer dos caras opuestas de la selección natural. La selección negativa o purificadora mantiene (conserva) secuencias con funciones importantes, porque los cambios reducen la probabilidad de que el individuo sobreviva y se reproduzca. Estas regiones del genoma evolucionan más lentamente que las secuencias no funcionales cuyo cambio no tiene efecto en la aptitud del individuo y no están sometidas a la selección natural (se dice que tales secuencias experimentan evolución neutra). En cambio, la selección positiva o darwiniana promueve la asociación y evolución al seleccionar cambios de secuencia que hacen a los individuos mejor adaptados a su ambiente y por tanto les dan mayores probabilidades de sobrevivir y reproducirse. Estas regiones evolucionan más rápido que los segmentos no funcionales.

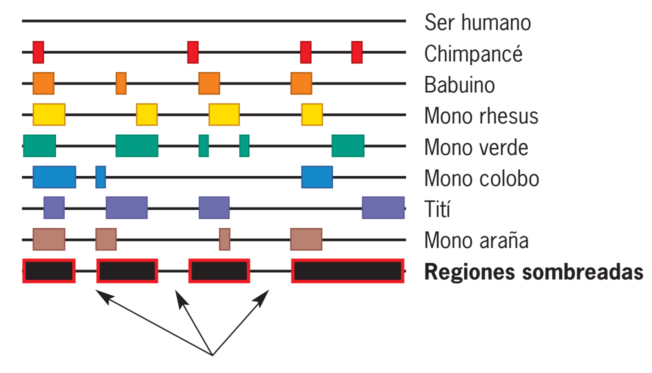


FIGURA 10-29 Pequeños fragmentos de DNA están muy conservados entre los seres humanos y especies relacionadas. La línea superior representa la secuencia nucleotídica de un segmento de DNA humano. Cada línea por debajo representa la secuencia nucleotídica de otros primates, como se señala a la derecha. Estos bloques en cada línea representan segmentos cuya secuencia nucleotídica se aparta del segmento que corresponde al humano. La línea inferior muestra las partes de este segmento de DNA que están muy conservadas en todas las especies ilustradas, esto es, algunas partes cuya secuencia no varía en ninguna de las ocho especies. (TOMADA DE R. A. GIBBS Y D. L. NELSON, SCIENCE 299:1333, 2003; © 2003, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE.)

es posible identificar las regiones muy conservadas por decenas de millones de años. Sin embargo, esta medida no es capaz de reconocer las secuencias funcionales del genoma humano que tienen un origen evolutivo más cercano. Por ejemplo, lo anterior puede incluir a genes presentes en los seres humanos y ausentes en el ratón o regiones reguladoras que han variado su secuencia durante el curso evolutivo de los primates para permitir que se unan a nuevas proteínas reguladoras. Las regiones del genoma que están dentro de estas categorías son las mejor identificadas por comparación de secuencias en especies muy cercanas. Por ejemplo, en un estudio se compararon diferentes segmentos correspondientes al genoma de 17 especies distintas de primates. Estos ensayos generaron los datos que se ilustran en la figura 10-29. Las partes con alto grado de conservación (que se indican con flechas en la parte inferior de la figura) corresponden a segmentos que codifican proteína (exones) y pequeñas regiones que casi siempre se unen a las proteínas que regulan el gen. Como puede observarse en esta figura, la comparación de secuencias de dos o tres especies diferentes no es suficiente para reconocer a la mayoría de las secuencias más conservadas dentro de estos genomas. Está en marcha un esfuerzo concertado (con el nombre de Proyecto ENCODE) para identificar todos los elementos funcionales presentes en el genoma humano.

En esta exposición el interés ha recaído en las secuencias conservadas, que informan acerca de características que el ser humano comparte con otros organismos. Si se desea comprender mejor la evolución biológica única del ser humano, es necesario ver más de cerca aquellas partes del genoma que lo distinguen de otras especies. Los chimpancés son nuestro pariente vivo más cercano, pues compartimos un ancestro común que vivió en una época tan reciente como hace apenas cinco a siete millones de años. Se pensó que un análisis detallado de las diferencias de la secuencia del DNA y en la organización génica entre los seres humanos y el chimpancé podría decir mucho acerca de la base genética de características surgidas recientemente que hacen único al ser humano, como la marcha erguida y el uso avanzado de herramientas y lenguaje. Estas últimas características se han rastreado al cerebro humano, que tiene un volumen aproximado de 1 300 cm^3 (unas cuatro veces el del cerebro del chimpancé).

En 2005 se publicó el borrador del genoma del chimpancé. En términos generales, los genomas del chimpancé y humano difieren en alrededor de 4%, lo cual significa decenas de millones de diferencias, un nivel de divergencia considerablemente mayor que el esperado con base en estudios preliminares. Si bien parte de esta divergencia se debe a cambios de nucleótidos individuales entre los dos genomas, el grueso se atribuye a diferencias mayores, como deleciones y duplicaciones de segmentos (véase la nota al pie de la página 410).

Los investigadores han podido identificar cientos de genes en el linaje humano que evolucionan a un ritmo más rápido que el de fondo (o neutro), supuestamente en respuesta a la selección natural. Sigue siendo incierto cuáles de estos genes en su caso contribuyen a "hacernos humanos". Algunos de los genes de más rápida evolución codifican proteínas implicadas en regular la expresión génica (esto es, factores de transcripción). Son precisamente los tipos de genes que se esperaría que generaran mayores diferencias fenotípicas, porque pueden afectar la expresión de muchos otros genes. De hecho, se supone que las diferencias entre factores de transcripción del chimpancé y el ser humano son la causa de las diferencias de expresión de las proteínas cerebrales que se presentan en la figura 2-47. También se han descrito muchas otras diferencias, incluida la desactivación de un gen de miosina en el linaje humano que podría estar vinculada con la escasa musculatura mandibular en el ser humano, la pérdida de genes para receptores olfatorios que podría haber reducido nuestro sentido del olfato, y alteraciones en determinados genes codificadores de RNA que parecen afectar el desarrollo encefálico.

A la fecha, el mayor interés en este campo se ha concentrado en un gen que codifica un factor de transcripción llamado *FOXP2*. Una comparación de las proteínas FOXP2 del ser humano y el chimpancé muestra dos diferencias de aminoácidos que han aparecido en el linaje humano desde el tiempo de la separación a partir del ancestro común más reciente. Lo que hace tan interesante a este gen es que las personas con mutaciones en el gen *FOXP2* sufren un grave trastorno del habla y el lenguaje. Entre otros déficit, los sujetos con este trastorno son incapaces de realizar los movimientos musculares finos de los labios y la lengua que se requieren para la comunicación oral. Los cálculos sugieren que los cambios en este "gen del habla" que lo distinguen de la versión del chimpancé se "fijaron" en el genoma humano en los pasados 120 000 a 200 000 años, el lapso en que se piensa que apareció el hombre moderno. Estos descubrimientos sugieren que los cambios en el gen *FOXP2* pudieron haber tenido un cometido importante en la evolución humana. El efecto de la secuencia del genoma humano en la práctica de la medicina se analiza en la sección Perspectiva humana que sigue.

Variación genética dentro de la población humana

No hay en el mundo dos personas exactamente iguales, porque no existen dos individuos, aparte los gemelos idénticos, que tengan la misma secuencia de DNA en todo su genoma. El genoma humano cuya secuencia se determinó en el Proyecto Genoma Humano original provenía en su mayor parte de un solo varón. Desde que se completó la secuencia, se ha puesto mucha atención al modo en que la secuencia del DNA varía en la población humana. Los **polimorfismos genéticos** son sitios en el genoma que varían de un individuo a otro. Dicho término suele referirse a una variante génica que se presenta en cuando menos 1% de la población de una especie. El concepto de polimorfismo genético comenzó con el descubrimiento hecho en 1900 por el médico austriaco Karl Landsteiner de que las personas podrían tener cuando menos tres tipos sanguíneos alternos, A, B u O. Como se expone en la página 129, el grupo sanguíneo es determinado por diferentes alelos de un gen que codifica una enzima que transfiere azúcar. Ahora que se conoce la secuencia genómica humana, es posible buscar nuevos tipos de variación genética que en la "era pregenómica" podrían nunca haberse revelado.

Variación de la secuencia de DNA El tipo más común de variabilidad genética en seres humanos se presenta en sitios del genoma en que ocurren variaciones de nucleótidos individuales de un miembro a otro de la población. Estos sitios se denominan **polimorfismos de nucleótidos individuales** (**SNP**, del inglés *single nucleotide polymorphism*). La vasta mayoría de los SNP existen como dos alelos alternos, por ejemplo A o G. Se piensa que la mayor parte de los SNP surgieron por mutación sólo una vez durante el transcurso de la evolución humana, y son compartidos por individuos con un ancestro común. Se han identificado millones de SNP comunes comparando secuencias de DNA tomadas de los genomas de cientos de individuos de diversas poblaciones étnicas. En promedio, dos genomas humanos tomados al azar tienen alrededor de tres millones de diferencias de nucleótidos individuales entre ellos, o una cada mil pares de bases. Aunque esta podría parecer una cifra elevada, significa que los seres humanos son en promedio 99.9% idénticos entre sí con respecto a la secuencia de nucleótidos, una semejanza probablemente mucho mayor que en la mayoría de especies de mamíferos. Esta similitud de secuencia refleja el hecho de que al parecer somos una especie joven en términos evolutivos, y que el tamaño de nuestra población prehistórica era relativamente pequeño. Se estima que del vasto número de SNP en el genoma, alrededor de 60 000 de ellos se encuentran dentro de secuencias codificadoras de proteína y ocasionan sustituciones de aminoácidos en la proteína codificada. Esto corresponde a unas dos sustituciones de aminoácidos por gen. Se piensa que es este cuerpo de variación genética la principal causa de la variación fenotípica observada entre los seres humanos.

Variación en el número de copias Como se expuso en la página 404, la técnica de análisis de bandas de DNA depende de diferencias en la longitud de secuencias minisatélite, lo cual a su vez depende del número de copias de la secuencia que están presentes en sitios específicos de los cromosomas. Este es un ejemplo de *polimorfismo del número de copias* (*CNP*, del inglés *copy number polymorphism*). Recientemente se descubrió que en la población humana también son comunes muchos CNP de gran tamaño, que ocurren en cientos o aun miles de regiones distintas del genoma, incluidas grandes cantidades de genes codificadores de proteínas. Debido a tales CNP, muchas personas portan copias extra de uno o más genes que codifican proteínas de importancia fisiológica. Las copias extra de genes por lo general se vinculan con sobreproducción de una proteína, lo cual puede alterar el delicado balance bioquímico que existe dentro de una célula. Por ejemplo, se observa que una proporción significativa de los individuos que desarrollan enfermedad de Alzheimer de inicio temprano posee copias adicionales del gen *APP*, el cual codifica la proteína que se piensa es la causante de la enfermedad (pág. 66).

Variación estructural Como se ilustra en la figura 10-30*a*, es posible que algunos segmentos del genoma cambien como resultado de duplicaciones, deleciones, inserciones, inversiones (cuando una pieza de DNA se encuentra en la orientación inversa) y otros sucesos. Estos tipos de cambios típicamente implican segmentos de DNA cuya longitud va de miles a millones de pares de bases. Debido a su tamaño relativamente grande, estos tipos de polimorfismos se denominan *variantes estructurales*, y apenas comienza a captarse la magnitud e importancia de su presencia.

Desde los primeros días del análisis microscópico de los cromosomas se sabe que aun entre las personas saludables la estructura cromosómica varía. En la figura 10-30*b* se muestra un ejemplo de inversión cromosómica común cuya existencia se conoce desde hace más de 30 años. Estudios recientes revelan que las variantes estructurales de tamaño intermedio (demasiado pequeñas para verse al microscopio y demasiado grandes para detectarse con facilidad mediante análisis de secuencia ordinarios) son mucho más comunes de lo que se pensaba. Por ejemplo, en un estudio los investigadores compararon el genoma de un ser humano "normal" con la secuencia original generada por el Proyecto Genoma Humano y descubrieron que diferían en 297 variantes estructurales de tamaño intermedio (>8 kilobases): 139 inserciones, 102 deleciones y 56 inversiones. Éste es un nivel notable e inesperado de variación a gran escala. Como en el caso de los CNP, es posible que estas variantes estructurales contribuyan a la variabilidad en la propensión a enfermedades comunes.

En la sección Perspectiva humana del capítulo 12 se analizan efectos más drásticos de variantes estructurales en la salud del ser humano.

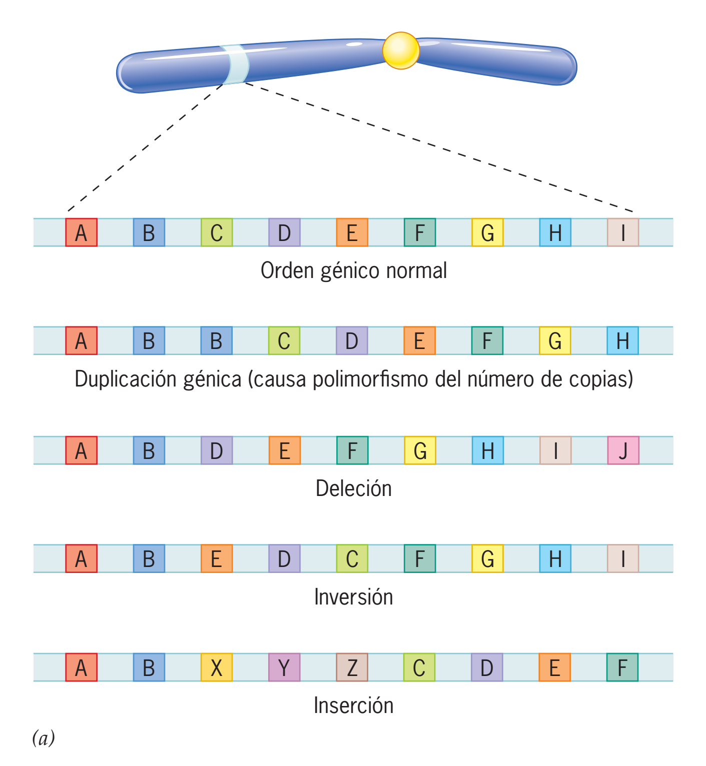


FIGURA 10-30 Variantes estructurales. *a*) Representación esquemática de los principales tipos de polimorfismos genómicos que implican un segmento significativo de un cromosoma (p. ej., miles de pares de bases). La mayor parte de estos polimorfismos son demasiado pequeños para detectarse en el examen microscópico de cromosomas pero se detectan con facilidad cuando se determina el número o la ubicación cromosómica (o ambas cosas) de genes individuales. *b*) A la izquierda está un cromosoma humano 9 normal y a la derecha un cromosoma humano 9 que contiene una gran inversión que incluye el centrómero del cromosoma (flecha). La inversión, que es claramente visible al microscopio, se encuentra en 1 a 3% de la población. (*B*, REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE C. LEE, NATURE GEN. 37:661, 2005 © COPYRIGHT 2005 POR MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)

PERSPECTIVA HUMANA

Aplicación de análisis genómicos a la medicina

En las décadas pasadas, cientos de genes se han caracterizado como causa de enfermedades hereditarias raras. En la mayoría de estos estudios se han detectado familias con elevada frecuencia de una anomalía en particular. El reto inicial consistió en determinar qué región del genoma comparten todos los miembros afectados de la familia. Cuando se reconocen la región vinculada con el trastorno y el gen afectado, el DNA de este segmento se aísla y se obtiene el gen mutante. Este tipo de procedimiento genético es accesible para genes con una alta penetración, es decir, genes con una mutación que aparece en todos los pacientes con la anormalidad. Por ejemplo, el gen mutado en la enfermedad de Huntington (pág. 405) posee una alta penetración. Además, ningún otro gen del genoma causa la afección.

La mayor parte de los padecimientos comunes que afectan a la especie humana, como el cáncer, cardiopatías, enfermedad de Alzheimer, diabetes, asma y depresión, tienen un componente genético y se dice que poseen tendencia a presentarse y heredarse en las familias. Empero, a diferencia de las anomalías hereditarias, como la enfermedad de Huntington, no existe un solo gen ligado a esta afección. En realidad, se sabe que numerosos genes se relacionan con el riesgo de padecer la enfermedad. Además, factores no genéticos (p. ej., causas ambientales) modifican el desarrollo del trastorno. Así, la probabilidad de desarrollar diabetes se incrementa de manera notoria en sujetos que tienen un aumento considerable de peso o bien la probabilidad de desarrollar cáncer de pulmón se eleva con el tabaquismo. Uno de los objetivos de la comunidad de investigación médica es identificar los genes que contribuyen al desarrollo de estas enfermedades comunes, pero complejas en cuanto al mecanismo genético.

Debido a su baja penetración, la mayoría de los genes que inducen un mayor riesgo de desarrollar afecciones graves no puede identificarse a través de estudios de ligamiento en familias.[a] En cambio, tales genes se identifican mejor analizando la ocurrencia de enfermedad en grandes poblaciones. Para efectuar este tipo de investigación, los científicos comparan los genotipos de individuos que tienen la enfermedad específica con individuos de antecedentes étnicos similares no afectados. El objetivo es descubrir un *nexo* (o correlación) entre un trastorno en particular, como la diabetes, y polimorfismos genéticos en común. La utilidad potencial de este método es ilustrada por el descubrimiento a principios del decenio de 1990 de un fuerte nexo entre un alelo común del gen que codifica la lipoproteína ApoE y la probabilidad de desarrollar enfermedad de Alzheimer. En estos estudios se observó que individuos que tenían cuando menos una copia del alelo *APOE4* del gen tienen mucha mayor probabilidad de desarrollar esta enfermedad neurodegenerativa discapacitante que las personas que carecen del alelo. Estos descubrimientos han abierto una rama importante de investigación sobre el vínculo entre metabolismo del colesterol, salud cardiovascular y enfermedad de Alzheimer.

Los análisis de vinculación pueden dividirse en dos tipos amplios, los estudios de *genes candidatos* y los estudios *a nivel de todo el genoma*. En el primer caso, los investigadores buscan asociaciones entre una enfermedad y polimorfismos dentro de genes candidatos específicos que se han seleccionado en virtud de algún conocimiento previo acerca de sus funciones que los haga blancos probables. Por ejemplo, un equipo de investigadores del sida se concentraron en el gen *CCR5*, porque se sabía que es un correceptor para el VIH-1 al ingresar a la célula hospedadora. Compararon la frecuencia de polimorfismos de *CCR5* en miembros infectados y no infectados de una población que se sabía estaba en alto riesgo de contraer la enfermedad. Descubrieron que personas de esta población que eran homocigotas para una versión del gen *CCR5* que contenía una deleción específica de 32 pares de bases eran resistentes a la infección por el VIH, mientras que los homocigotos para este polimorfismo tenían una progresión más lenta del sida florido. Este alelo D32 se encuentra en alrededor de 13% de los individuos de origen europeo, pero es raro en otros grupos investigados, incluidos los de origen africano.

Como su nombre lo indica, los estudios al nivel de todo el genoma buscan nexos entre un estado patológico y polimorfismos que pueden localizarse en cualquier lugar del genoma. Para esto se requiere determinar la secuencia de nucleótidos de segmentos grandes del genoma de todos los sujetos que participan en el estudio. Los estudios de genes candidatos tienen mejores perspectivas de éxito porque es probable que estos genes intervengan en la enfermedad. Los estudios al nivel del genoma son más desafiantes, pero presentan mayores probabilidades de revelar nuevos indicios acerca de las bases subyacentes de la enfermedad al poner al descubierto genes que no se sospechaba que tuvieran participación. Los productos de estos genes pueden en última instancia convertirse en blancos de nuevas avenidas de farmacoterapia.

Como se dijo antes, los tipos más comunes de variabilidad genética en seres humanos son diferencias de un solo nucleótido (SNP), que están distribuidas casi de manera uniforme en todo el genoma. Es probable que muchos de los SNP que modifican la especificidad codificadora de un gen, o la regulación de la expresión de un gen, tengan un cometido importante en nuestra suceptibilidad a enfermedades complejas. Como el costo de genotipificar muestras de DNA humano ha disminuido en grado notable, los investigadores han comenzado a explorar los genomas de grandes cantidades de personas para identificar SNP que ocurren más a menudo en sujetos afectados por una enfermedad específica que en individuos saludables. Incluso si los SNP identificados no son la causa directa de la enfermedad, sirven como marcadores genéticos de un locus cercano que pudiera serlo. Estos principios son bien ilustrados por un estudio al nivel del genoma publicado en 2005 sobre degeneración macular vinculada con la edad (AMD, del inglés *age-related macular degeneration*), que es la causa principal de ceguera en ancianos. Inicialmente, los investigadores compararon 96 casos de AMD con 50 testigos, en busca de un nexo de la enfermedad con más de 100 000 SNP que se habían genotipificado en los sujetos. Encontraron una fuerte relación entre individuos con la enfermedad y un SNP en común presente dentro del intrón (parte no codificadora) de un gen llamado *CFH* que interviene en inmunidad e inflamación. Los homocigotos para este SNP tuvieron 7.4 veces mayor riesgo de sufrir la enfermedad. Una vez que identificaron esta región del genoma como asociada AMD, determinaron la secuencia del gen *CFH* completo en 96 individuos. Hallaron que el SNP identificado estaba fuertemente ligado (véase la exposición de haplotipos más adelante) con un polimorfismo dentro de la región codificadora del gen *CHF*, que colocaba una histidina en un sitio específico de la proteína. Otros alelos de la proteína CFH que no se relacionaban con riesgo de AMD tenían una tirosina en esta posición. Estas observaciones constituyen pruebas adicionales de que la inflamación es un factor subyacente en el desarrollo de AMD y señalan un blanco bien definido en la búsqueda de tratamientos para la enfermedad. Es posible que con el tiempo, la susceptibilidad a cada trastorno sea revelada por su propio "perfil de SNP". En consecuencia, tal vez un día sea posible determinar si una persona está genéticamente predispuesta a sufrir cardiopatía, enfermedad de Alzheimer o un tipo específico de cáncer simplemente identificando cuáles nucleótidos están presentes en posiciones clave de su genoma. Esto podría permitir a los individuos modificar sus hábitos a edad temprana, con el objetivo de prevenir el desarrollo posterior de un trastorno en particular.

Es posible que los perfiles SNP también den una indicación de cómo reaccionará una persona a un fármaco específico, si es probable que éste les sea de utilidad, si es probable que sufra efectos secundarios graves, o alguna combinación de ello. Por citar un ejemplo, los individuos que portan un alelo con dos SNP específicos en un gen que codifica la enzima TPMT son incapaces de metabolizar una clase de tiopurinas que se usan con frecuencia para tratar un tipo de leucemia infantil. Los homocigotos para este alelo tienen un riesgo muy alto de desarrollar una supresión potencialmente letal de la médula ósea cuando reciben las dosis normales de fármacos tiopurínicos. La mayoría de las enfermedades puede tratarse con varios medicamentos alternos, así que la elección apropiada de éstos es un aspecto importante de la práctica de la medicina. La industria farmacéutica espera que los datos de SNP finalmente lleven a una era de "farmacoterapia personalizada" que permita a los médicos prescribir fármacos específicos diseñados para cada paciente individual con base en su perfil genético. Es posible que esta era haya comenzado con la reciente aprobación por la FDA de un biochip con DNA, que permite a los médicos inspeccionar el DNA del paciente a fin de determinar cuáles variantes de dos genes de citocromo P-450 distintos posee (pág. 284). Estos genes ayudan a determinar la eficiencia con que una persona metaboliza diversos fármacos, que van desde analgésicos y antidepresivos hasta antipiréticos de venta libre.

[a] No todos los genes implicados en enfermedades comunes tienen baja penetrancia. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer se presenta con alta frecuencia en personas que tienen determinados alelos *APP* (pág. 66), y el cáncer mamario ocurre con alta frecuencia en personas que tienen ciertos alelos *BRCA* (sección 16.3). Pero estos tipos de polimorfismos de alta penetrancia raros no son factores importantes en el desarrollo de la gran mayoría de los casos de esas enfermedades.

El uso de los datos de los SNP en estudios de relación supone un reto formidable debido al impresionante número de estos polimorfismos en el genoma. A medida que los investigadores estudian la distribución de los SNP en diferentes poblaciones humanas, se llevó a cabo un descubrimiento que puede simplificar estos estudios de relación: grandes bloques de SNP se han heredado juntos como una unidad en el curso de la evolución humana reciente. Para ilustrar lo anterior considérese lo siguiente: si existiera una base en particular en cada uno de los sitios polimórficos en una región en particular del cromosoma, entonces las bases de todos los otros sitios polimórficos en la región podrían predecirse con un alto porcentaje de seguridad (p. ej., 90%). De acuerdo con la visión actual, los segmentos de SNP se han retenido juntos en el genoma en muchas generaciones debido a la recombinación genética (p. ej., cruzamiento) que no ocurre de manera aleatoria a lo largo del DNA, como se explicó en la discusión del mapa de genes en la página 394. En cambio, existen "puntos calientes" en los que la recombinación sucede de manera frecuente y se intercambian bloques de DNA entre los "puntos calientes" que tienen una baja frecuencia de recombinación. Como resultado, ciertos bloques de DNA (casi siempre de unos 20 kb en longitud) tienden a permanecer intactos debido a que se heredan de generaciones a generaciones. Estos bloques se conocen como **haplotipos**. Los haplotipos se asemejan a "alelos gigantes multigénicos"; si se selecciona un sitio específico en un cromosoma particular, existe sólo un limitado número de haplotipos alternativos que pueden hallarse en esta región (fig. 1). Cada uno de los haplotipos alternativos está definido por un pequeño número de SNP (llamados "SNP etiqueta") en esta región del genoma. Una vez que se ha determinado la identidad de un puñado de SNP etiqueta dentro de un haplotipo, se conoce la identidad del haplotipo completo.

El promedio de la longitud de los haplotipos y el número de versiones alternativas de cada haplotipo varían entre diferentes poblaciones étnicas. Por ejemplo, las personas descendientes de individuos del norte de Europa parecen tener haplotipos grandes, con pocas versiones alternativas, en comparación con las personas que descienden de los africanos. Este descubrimiento sugiere que el grupo anterior procede de una población relativamente pequeña en la que muchos de los haplotipos de sus ancestros se habían perdido. De acuerdo con un cálculo, tan pocos como 50 individuos que vivieron hace 27 000 o 50 000 años dieron lugar a todas las poblaciones que hoy día están en el norte de Europa. Las poblaciones africanas presentan la variabilidad más grande de haplotipos, según otros estudios que indican que las especies del ser humano moderno surgieron de África (pág. 404).

En 2002, unos 25 grupos de investigadores comenzaron un trabajo en colaboración, llamado Proyecto Internacional Mapa de Haplotipos (HapMap), encaminado a identificar y localizar ("mapear") los diversos haplotipos que existen en la población humana. El HapMap contendría todos los haplotipos comunes (es decir, haplotipos presentes en cuando menos 5% de la población) presentes a lo largo de cada uno de los 24 cromosomas humanos diferentes en 270 miembros de cuatro poblaciones étnicamente distintas. Las poblaciones por examinar fueron yoruba de África, han de China, japoneses y europeos occidentales (descendientes establecidos en Utah). El proyecto finalizó en 2006 y dio por resultado la publicación de un HapMap constituido con base en más de cuatro millones de SNP etiqueta espaciados uniformemente en todo el genoma.

Ahora que el HapMap está disponible, los investigadores deben poder identificar nexos entre una enfermedad específica y un haplotipo dado. Una vez que se establece tal nexo, la región del genoma que contiene el haplotipo puede analizarse en cuanto al gen o los genes en particular que contribuyen a la susceptibilidad de alguna enfermedad. El análisis de los mapas de haplotipos puede también proporcionar datos sobre orígenes y migraciones de las poblaciones humanas y arrojar valiosos indicios sobre los factores que pudieron haber moldeado el genoma humano. Esto es ilustrado por el siguiente ejemplo. El que un adulto pueda beber leche o no sin sufrir molestias estomacales (es decir, el que sea tolerante a la lactosa o no) depende de cuáles alelos del gen de la lactasa porte en su genoma. La tolerancia a la lactosa se vincula con un haplotipo inusualmente largo que contiene un alelo del gen de la lactasa el cual se expresa de manera persistente en la edad adulta. Este haplotipo en particular está presente con alta frecuencia en poblaciones europeas, que han tenido una larga historia de cría de animales lecheros, y es raro en la mayoría de las poblaciones subsaharianas y del sureste asiático, que históricamente no han criado dichos animales. Su alta frecuencia entre europeos sugiere que este haplotipo particular estuvo bajo intensa presión selectiva positiva en poblaciones que dependían de productos lácteos para su nutrición. Este haplotipo individual tiene más de un millón de bases de longitud, lo cual indica que no ha estado junto como bloque un tiempo suficientemente grande para que el entrecruzamiento haya tenido oportunidad de romperse en fragmentos más pequeños. De hecho, se estima que este haplotipo estuvo sujeto a fuerte presión selectiva hace 5 000 a 10 000 años, aproximadamente la época en que se cree que apareció la cría de hatos lecheros.

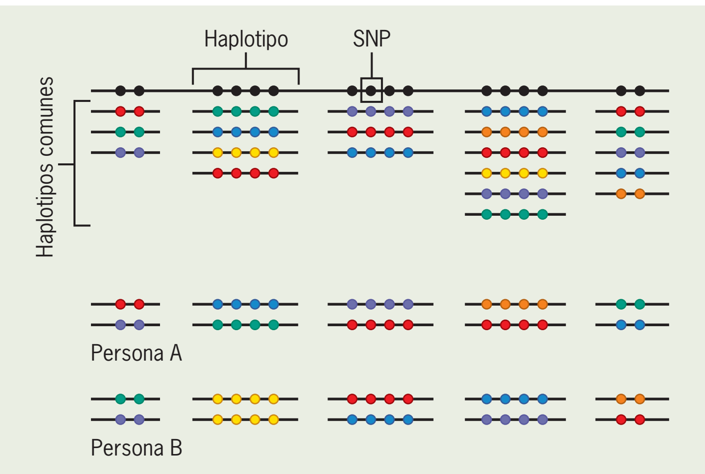
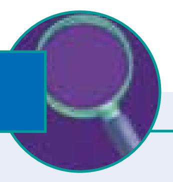


FIGURA 1 El genoma se divide en bloques (haplotipos). La línea superior muestra un segmento hipotético de DNA que contiene un número de SNP (cada SNP se indica con un círculo negro). Este segmento particular consiste en cinco haplotipos separados por cortas secuencias de DNA muy variables. Cada haplotipo aparece como un pequeño número de variantes. De los haplotipos mostrados aquí existen tres a seis diferentes variantes. Cada variante de haplotipo se caracteriza por un grupo específico de SNP, indicado por los círculos de color. Todos los SNP de un haplotipo particular variante están dibujados en el mismo color para indicar que se heredaron como un grupo y que se encuentran juntos en diferentes miembros de la población. Cada persona representada en la parte inferior de la ilustración tiene una combinación específica de haplotipos en sus dos cromosomas. Algunas variantes de haplotipos se encuentran en muchos diferentes grupos étnicos y otras poseen una distribución mucho más limitada.

VÍAS EXPERIMENTALES



La naturaleza química del gen

Tres años después de que Gregor Mendel presentara los resultados de su trabajo acerca de la herencia en plantas de guisantes, Friedrich Miescher se graduó en una escuela de medicina en Suiza y viajó a Tübingen, Alemania; su objetivo era hacer una estancia de un año y estudiar bajo la dirección de Ernst Hoppe-Seyler, uno de los químicos más notables (y tal vez el primer bioquímico) de ese periodo. Miescher se interesó en las sustancias químicas contenidas en el núcleo de la célula. Para aislar material de los núcleos celulares con un mínimo de contaminación por los componentes citoplásmicos, Miescher necesitaba células con núcleos grandes y fáciles de obtener en gran cantidad. Eligió leucocitos, que obtuvo del pus de vendajes quirúrgicos desechados por una clínica local. Miescher trató las células con ácido clorhídrico diluido al cual añadió un extracto desproteinizado de estómago de cerdo (dicho extracto contenía pepsina, una enzima proteolítica). El residuo conseguido después de este tratamiento se componía sobre todo de núcleos celulares aislados que se asentaron en el fondo del tubo. A continuación extrajo los núcleos con álcali diluido. El material soluble del álcali se purificó de manera adicional mediante precipitación con ácido diluido y nueva extracción con álcali diluido. Miescher observó que el extracto alcalino contenía una sustancia con propiedades diferentes a las descubiertas con anterioridad: era una molécula muy grande, de carácter ácido y rica en fósforo. Denominó a este material "nucleína". El año de residencia de Miescher concluyó y retornó a su hogar en Suiza, en tanto que Hoppe-Seyler, cauteloso acerca de los resultados, repitió el trabajo. Confirmados los resultados, Miescher publicó los hallazgos en 1871.[1]

De vuelta en Suiza, Miescher continuó sus estudios de la química del núcleo celular. Como vivía cerca del Rhin, podía obtener con facilidad salmones que nadaban contra la corriente y arribaban llenos de huevecillos o espermatozoides maduros. Los espermatozoides eran células ideales para estudiar los núcleos. Al igual que los leucocitos, se pueden obtener en gran cantidad y 90% de su volumen corresponde al núcleo. Las preparaciones de Miescher con nucleína obtenida de espermatozoides tenían un porcentaje más elevado de fósforo (casi 10% de su peso), en comparación con los leucocitos, lo que indicaba que poseían menos proteína contaminante. En realidad, fueron las primeras preparaciones de DNA relativamente puro. El término "ácido nucleico" lo acuñó en 1889 Richard Altmann, discípulo de Miescher, quien experimentó con métodos de purificación de DNA libres de proteínas de varios tejidos animales y levaduras.[2]

En los últimos dos decenios del siglo XIX, numerosos biólogos se dedicaron al estudio de los cromosomas y describieron su evolución durante la división celular y el lapso entre sus divisiones (pág. 390). Una forma de observar cromosomas consistió en teñir estas estructuras celulares con colorantes. Un botánico de nombre E. Zacharias descubrió que el mismo colorante que revelaba los cromosomas también teñía una preparación de nucleína extraída con el procedimiento de Miescher de digestión con pepsina en un medio de HCl. Además, cuando las células extraídas con pepsina y HCl se extrajeron de modo subsecuente con álcali diluido, procedimiento ya conocido para extraer nucleína, el residuo celular (incluidos los cromosomas) ya no contenía material teñible. Estos y otros resultados apoyaron de forma consistente la idea de que la nucleína era un componente de los cromosomas. Otto Hertwig, quien estudió la evolución de los cromosomas durante la fecundación, afirmó en 1884 en una disertación profética: "creo que cuando menos he hecho muy probable que la nucleína sea la sustancia encargada no sólo de la fecundación, sino también de la transmisión de las características hereditarias".[3] De manera irónica, cuanto más se aprendía acerca de las propiedades de la nucleína, menos se la consideraba candidata para ser el material genético.

Durante los 50 años que siguieron al descubrimiento del DNA de Miescher se describió la química de la molécula y la naturaleza de sus componentes. Algunas de las contribuciones más importantes en esta tarea fueron obra de Phoebus Aaron Levene, quien emigró de Rusia a Estados Unidos en 1891 y con el tiempo logró un puesto en el *Rockefeller Institute* de Nueva York. Levene fue quien por fin resolvió uno de los problemas más resistentes de la química del DNA cuando en 1929 determinó que el azúcar de los nucleótidos era la 2-desoxirribosa.[4] Para aislar el azúcar, Levene y E. S. London colocaron el DNA en el estómago de un perro mediante una abertura quirúrgica y luego recolectaron muestras del intestino del animal. A medida que el DNA pasaba por el estómago y el intestino, varias enzimas del conducto digestivo del animal actuaron sobre la molécula y fragmentaron los nucleótidos en sus componentes y entonces se pudieron aislar y analizar. Levene resumió sus conocimientos de los ácidos nucleicos en una monografía publicada en 1931.[5]

A Levene se le acredita la determinación de la estructura en bloques del DNA, aunque también se le imputa el mayor tropiezo u obstáculo en la búsqueda del material genético. En este periodo, cada vez fue más evidente que las proteínas eran muy complejas y mostraban gran especificidad como catalizadores en una notable variedad de reacciones químicas. Por otra parte, se pensó que el DNA se integraba con bloques formados por los cuatro nucleótidos repetidos de forma monótona. El principal defensor de esta concepción del DNA, que se llamó teoría de los tetranucleótidos, fue Phoebus Levene. Puesto que los cromosomas sólo contenían dos elementos, es decir, DNA y proteína, pocos dudaban que la proteína fuera el material genético.

Mientras tanto, conforme se analizaba la estructura del DNA, se desarrolló una nueva línea de investigación en apariencia sin relación con el campo de la bacteriología. A principios del decenio de 1920 se observó que algunas especies de bacterias patógenas eran capaces de crecer en el laboratorio en dos formas diferentes. Las bacterias con capacidad virulenta, esto es, células bacterianas causantes de enfermedad, formaron colonias con morfología lisa, regular y en forma de domo. Por el contrario, las células bacterianas no virulentas crecieron en colonias de morfología rugosa, plana e irregular (fig. 1).[6] El microbiólogo británico J. A. Arkwright introdujo los términos liso (S) y rugoso (R) para describir estos dos tipos. Al observarlas al microscopio, las células que formaban las colonias S estaban rodeadas por una capa de consistencia gelatinosa, de la cual carecían las células de las colonias R. La cápsula bacteriana protege a las bacterias de las defensas del hospedador, lo que explica por qué las células R, sin cápsula, no provocan infección en animales de laboratorio.

Debido a su gran efecto sobre la salud humana, las bacterias causantes de neumonía (*Streptococcus pneumoniae*, o neumococos) son desde hace mucho tiempo foco de atención entre los microbiólogos. En 1923, Frederick Griffith, médico del *British Ministry of Health*, demostró que los neumococos también crecen como colonias S o R y además que las dos formas eran interconvertibles, es decir, en ocasiones una bacteria R podía convertirse en una bacteria S, o viceversa.[7] Por ejemplo, Griffith observó que si inyectaba un número considerable de bacterias R a un ratón, el animal casi siempre desarrollaba neumonía y producía bacterias que formaban colonias de morfología S.

Con anterioridad se había demostrado que el neumococo se presentaba en varios tipos distintos (I, II y III), distinguibles entre sí a nivel inmunológico. En otras palabras, se pueden obtener anticuerpos

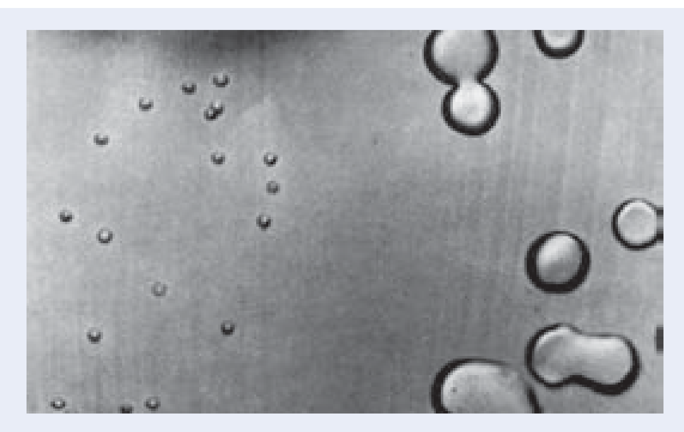


FIGURA 1 A la derecha se observan colonias coalescentes formadas con neumococos virulentos de tipo S y a la izquierda colonias pequeñas con neumococos no virulentos de tipo R. Como se describe después, las células de estas colonias S en particular son el resultado de la transformación de la bacteria R por DNA de los neumococos del tipo S muertos por calor. (TOMADA DE O. T. AVERY, C. M. MACLEOD Y M. MCCARTY, J EXP MED 1944; 79:153; CON AUTORIZACIÓN DE ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

de animales infectados que sólo reaccionan con uno de los tres tipos. Más aún, una bacteria de un tipo nunca da lugar a células de otro tipo. Cada uno de los tres tipos de neumococos podía ocurrir en las formas S o R.

En 1928, Griffith realizó un descubrimiento sorprendente cuando inyectó varias preparaciones bacterianas en un ratón.[8] La inyección de numerosas bacterias S muertas por calor o de un pequeño número de bacterias R vivas no causó por sí misma ningún daño al ratón. Sin embargo, cuando se inyectaron juntas las preparaciones al mismo ratón, éste desarrolló neumonía y murió. Se pudieron aislar y cultivar bacterias virulentas del ratón. Para ampliar sus datos, inyectó combinaciones de bacterias de diferentes tipos (fig. 2). De manera inicial inyectó a ocho ratones con bacterias S de tipo I muertas por calor junto con un pequeño inóculo de la cepa R tipo II de bacterias vivas. Dos de los ocho animales contrajeron neumonía y Griffith pudo aislar y cultivar células bacterianas S tipo I virulentas de ratón infectado. Puesto que era imposible que las bacterias muertas por calor volvieran a la vida, Griffith concluyó que las células muertas de tipo I habían suministrado algo a las células vivas no encapsuladas de tipo II que las transformó en la forma encapsulada de tipo I. Cuando creció en cultivo, la bacteria transformada continuó su producción de células de tipo I y en consecuencia el cambio era estable y permanente.

Los datos de Griffith acerca de la transformación los confirmaron pronto varios laboratorios de todo el mundo, incluido el de Oswald Avery, inmunólogo del *Rockefeller Institute*, la misma institución donde trabajaba Levene. Al principio, Avery dudó de que una sustancia liberada por una célula muerta pudiera alterar el aspecto de una célula viva, pero se convenció cuando Martin Dawson, un joven ayudante, confirmó los mismos resultados en su laboratorio.[9] Entonces Dawson intentó demostrar que la transformación no ocurre siempre en un animal hospedador vivo. Un extracto crudo de bacterias S muertas, mezclado con un pequeño número de células no virulentas (R) cultivadas en presencia de antisuero R podía convertir las células R en la forma L virulenta. Las células transformadas siempre fueron del tipo característico (I, II o III) de las células S muertas.[10]

El siguiente paso lo dio J. Lionel Alloway, otro miembro del laboratorio de Avery, quien tuvo que solubilizar el agente transformante. Esto se logró tras congelar y descongelar con rapidez las células muertas donantes, calentar en seguida las células fragmentadas, centrifugar la suspensión y hacer pasar el sobrenadante a través de un filtro de porcelana cuyos poros impedían el paso de las bacterias. El extracto soluble así filtrado mostró la misma capacidad transformadora que las células muertas por calor al principio.[11]

En los siguientes 10 años, Avery y sus colegas enfocaron su atención en purificar la sustancia causante de la transformación y determinar su identidad. Tan sorprendente como puede parecer ahora, en aquel tiempo ningún laboratorio del mundo se dedicó a identificar el "principio transformante", como lo llamó Avery. Los avances en este punto fueron lentos.[12] Con el tiempo, Avery y sus colaboradores, Colin MacLeod y Maclyn McCarty, lograron aislar una sustancia activa del extracto soluble capaz de causar la transformación en concentración de apenas una parte en 600 millones. Todas las pruebas sugerían que la sustancia activa era DNA, ya que: a) poseía muchas de las propiedades químicas características del DNA, b) ningún otro tipo de material pudo detectarse en la preparación y c) los ensayos con diferentes enzimas mostraron que sólo aquellas capaces de digerir el DNA podían inactivar el principio transformante.

El trabajo publicado en 1944 se escribió con escrupulosa cautela, sin conclusiones espectaculares, y afirmaba que los genes estaban

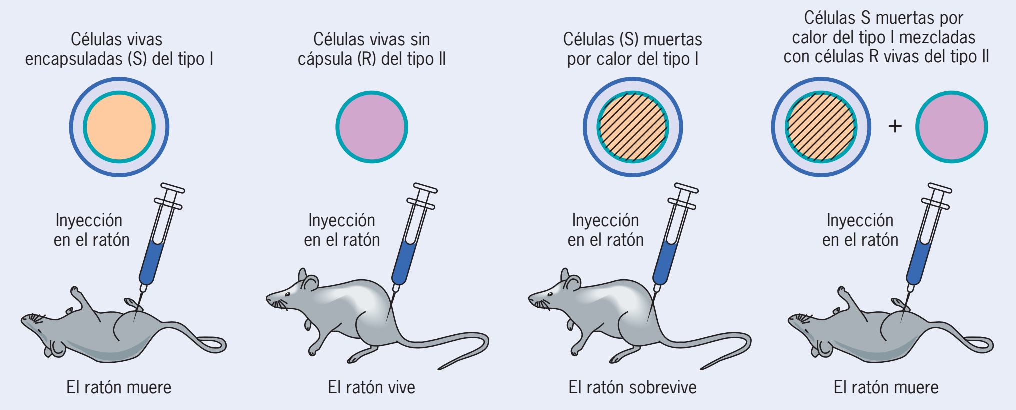


FIGURA 2 Se muestra el experimento que llevó a cabo Griffith cuando descubrió la transformación bacteriana.

constituidos por DNA y no por proteínas.[13] Es digno de mencionar que el trabajo suscitó escasa atención. Maclyn McCarty, uno de los tres autores, narró un incidente en 1949 cuando se los invitó a disertar en la *Johns Hopkins University*, junto con Leslie Gay, quien analizaba los efectos del nuevo fármaco dimenhidrinato para tratar el mareo de traslación. La gran sala estaba repleta y "luego de un breve periodo de preguntas y respuestas y después de la presentación del trabajo [de Gay], el presidente de la sociedad se presentó como un segundo orador. Muy poco de lo que se dijo se pudo escuchar a causa del bullicio de la gente que permanecía fuera de la sala. Cuando concluyó la salida de quienes abandonaron la sala pude contar, después de los primeros minutos de mi discurso, a escasas 35 personas que permanecieron en el auditorio, quizá para escuchar algo acerca de la transformación del neumococo o porque sintieron que debían quedarse por cortesía". Pero el verdadero potencial del descubrimiento de Avery se revela en una carta que escribió en 1943 a su hermano Roy, también bacteriólogo:

> Si estamos en lo correcto, y por supuesto que esto todavía no se ha demostrado, entonces los ácidos nucleicos no sólo son importantes desde el punto de vista estructural, sino también las sustancias activas en sentido funcional para definir la actividad bioquímica y las características específicas de una célula, además de que por medio de una sustancia química conocida es posible inducir cambios predecibles hereditarios en las células. Esto es algo que durante mucho tiempo fue el sueño de los genetistas (…) Suena como si un virus pudiera ser un gen. Pero no estoy interesado ahora en los mecanismos: un paso a la vez (…) Por supuesto, el asunto está erizado de implicaciones (…) Se relaciona con genética, química enzimática, metabolismo celular y síntesis de carbohidratos, etc. Sin embargo, en la actualidad se requieren suficientes pruebas bien comprobadas para convencer a todos de que la sal sódica del ácido desoxirribonucleico, libre de proteínas, posee actividad biológica y propiedades específicas y ésta es la prueba que ahora tratamos de obtener. Es muy divertido hacer burbujas, pero es más sensato reventarlas uno mismo antes que alguien lo haga.

Se han escrito muchos artículos y párrafos en libros para averiguar la razón que explique la falta de entusiasmo por los datos de Avery. Parte de ello quizá sea el estilo discreto del artículo y el hecho de que Avery era bacteriólogo, no genetista. Algunos biólogos estaban convencidos de que las preparaciones de Avery debían estar contaminadas con cantidades mínimas de proteína y que ese contaminante, no el DNA, era el agente transformador activo. Otros se preguntaban si los estudios acerca de la transformación en las bacterias podían tener relevancia alguna en el campo de la genética.

En los años siguientes a la publicación del trabajo tuvieron lugar cambios importantes en la genética. Se reconoció la existencia de cromosomas bacterianos y algunos prominentes genetistas volvieron su atención a esos procariotas. Estos científicos estaban convencidos de que el conocimiento logrado por el estudio de organismos celulares muy simples arrojaría luz sobre los mecanismos que operan en la mayoría de las plantas y animales más complejos. Además, los trabajos de Erwin Chargaff y sus colegas acerca de la composición de las bases del DNA acabaron con la idea de que esta molécula era sólo una simple serie de nucleótidos repetidos (se discute en la página 422).[14] Este dato reveló a los investigadores la posibilidad de que el DNA poseía las propiedades necesarias para desempeñar un papel importante en el almacenamiento de información.

Siete años después de la publicación del trabajo de Avery sobre la transformación bacteriana, Alfred Hershey y Martha Chase de los *Cold Spring Harbor Laboratories* de Nueva York se enfocaron en un sistema todavía más simple, los bacteriófagos, o virus que infectan células bacterianas. Alrededor de 1950, los investigadores reconocieron que aun los virus tenían un programa genético. Los virus inyectaron su material genético en una célula hospedadora, en la que pudo dirigir la formación de nuevas partículas virales dentro de la célula infectada. En cuestión de minutos, la célula infectada estalló y liberó nuevas partículas de bacteriófago que infectaron a células hospedadoras vecinas.

Era claro que el material genético capaz de dirigir la formación de la progenie viral debía ser DNA o proteínas, puesto que eran las únicas dos moléculas del virus. Observaciones con microscopio electrónico mostraron que durante la infección, la masa del bacteriófago permanecía fuera de la célula, fijada a la superficie celular por apéndices fibrosos (fig. 3). Hershey y Chase razonaron que el material genético del virus debía poseer dos propiedades. Primero, si el material dirige el desarrollo de nuevos bacteriófagos durante la infección, entonces debía pasar al interior de la célula infectada. Segundo, si el material porta información, ésta debe transmitirse a la segunda generación de bacteriófagos. Hershey y Chase prepararon dos grupos de bacteriófagos para utilizar como material infectante (fig. 4). Un grupo contenía DNA marcado con fósforo radiactivo (DNA[^{32}P]); el otro grupo poseía proteína marcada con azufre radiactivo (proteína[^{35}S]). Puesto que el DNA carece de átomos de azufre (S) y la proteína no tiene átomos de fósforo (P), estos dos radioisótopos suministraron marcas distinguibles en los dos tipos de macromoléculas. El plan experimental consistió en infectar a una población de células bacterianas con uno u otro tipo de bacteriófago, esperar unos pocos minutos y luego desprender los virus vacíos de la superficie celular. Luego de diferentes intentos y métodos para separar la cubierta del fago unida a la bacteria, observaron que la mejor manera de lograrlo era mantener la suspensión de bacterias infectadas a la acción de las hojas giratorias de una licuadora. Una vez desprendidas las partículas del virus de las células se pudieron centrifugar las bacterias del fondo del tubo y los virus vacíos permanecieron en el sobrenadante.

Con base en este procedimiento, Hershey y Chase determinaron la radiactividad dentro de las células en comparación con la radiactividad de las cubiertas vacías de fago. Observaron que en células

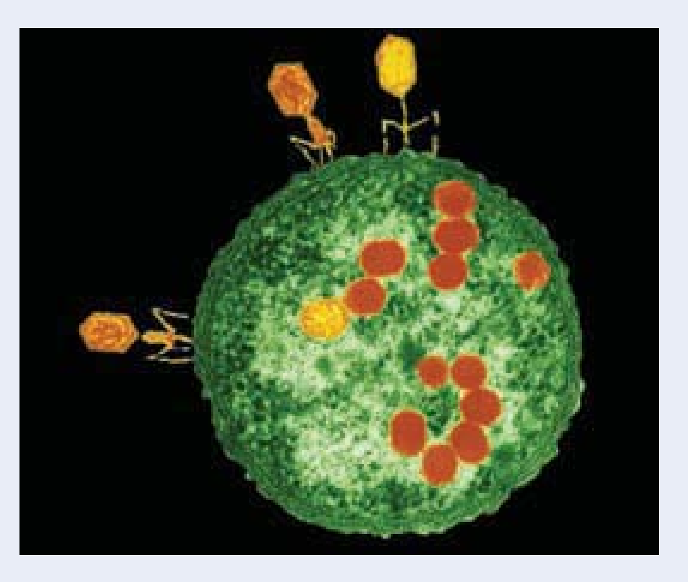


FIGURA 3 Micrografía electrónica de una célula bacteriana infectada por bacteriófago T4. Se observa un fago unido por medio de sus fibras de la cola a la superficie externa de la célula bacteriana, mientras que las cabezas de fagos apenas formados se ensamblan en el citoplasma de la célula hospedadora. (LEE D. SIMON/PHOTO RESEARCHERS, INC.)

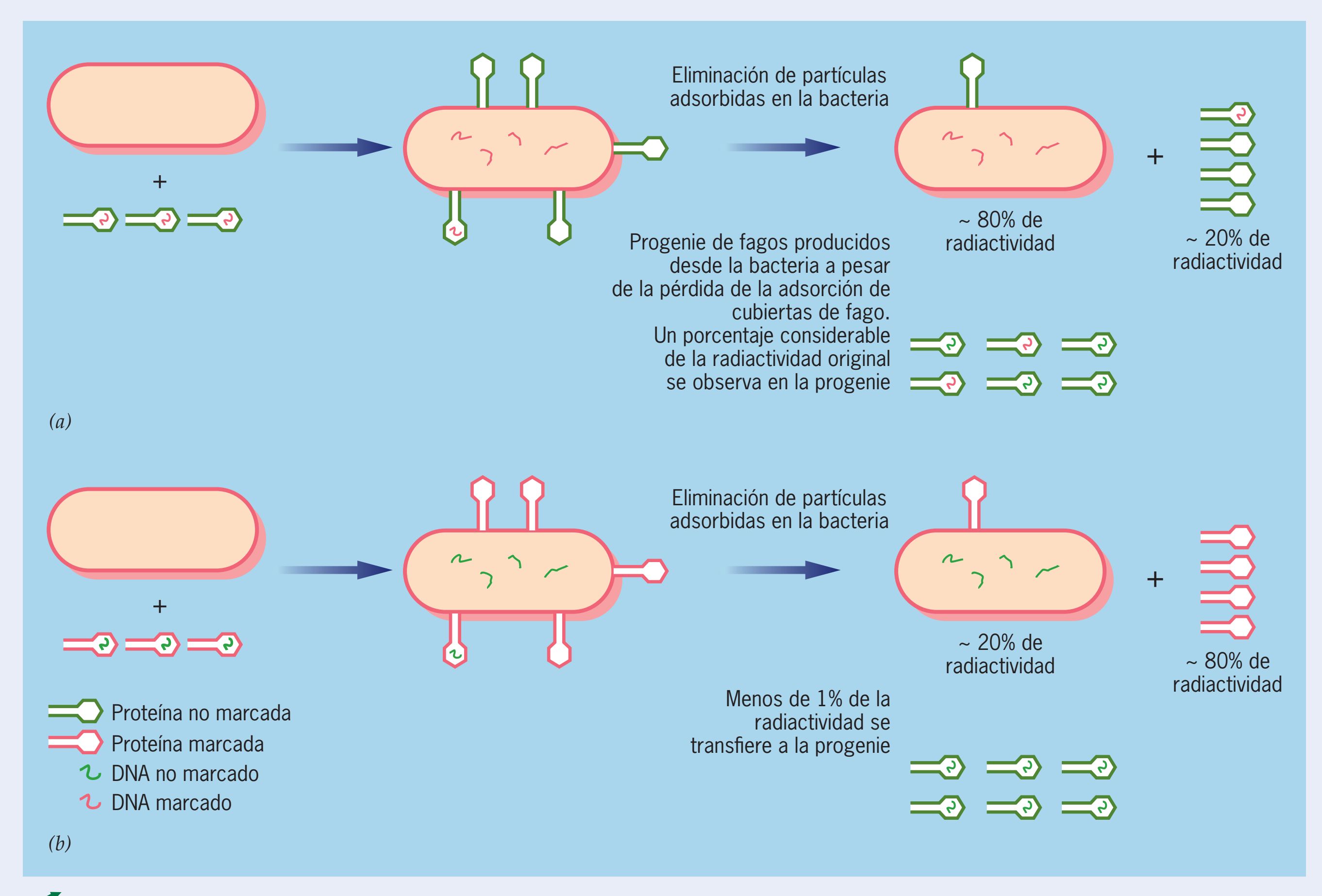


FIGURA 4 Experimento de Hershey-Chase que muestra que las células bacterianas infectadas con un fago que contiene DNA marcado con ^{32}P (moléculas de DNA en rojo) se marcan de forma radiactiva y producen progenie de fagos marcada. En cambio, las células bacterianas infectadas con fagos que contienen proteína marcada con ^{35}S (cubiertas de fago en rojo) no se marcan de manera radiactiva y producen sólo progenie sin marcas.

infectadas con un bacteriófago marcado con proteína radiactiva, la radiactividad permanecía en las cubiertas vacías. Por el contrario, en las células infectadas con un bacteriófago marcado con DNA radiactivo, la radiactividad pasaba al interior de la célula hospedadora. Respecto de la radiactividad transmitida a la siguiente generación, encontraron que menos de 1% de la proteína marcada en la progenie, y casi 30% del DNA marcado, pasaron a la siguiente generación.

La publicación de los experimentos de Hershey y Chase en 1952,[15] junto con el abandono de la teoría de los tetranucleótidos, limitó todos los obstáculos restantes para aceptar que el DNA era el material genético. Entonces surgió un nuevo y enorme interés por una molécula hasta entonces ignorada. El escenario estaba listo para el descubrimiento de la doble hélice.

Referencias

1. Miescher, J. F. 1871. *Hoppe-Seyler's Med. Chem. Untersuchungen.* 4:441.
2. Altmann, R. 1889. *Anat. u. Physiol., Physiol. Abt.* 524.
3. Taken from Mirsky, A. E. 1968. The discovery of DNA. *Sci. Am.* 218:78–88. (June)
4. Levene, P. A. & London, E. S. 1929. The structure of thymonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 83:793–802.
5. Levene, P. A. & Bass, L. W. 1931. *Nucleic Acids.* The Chemical Catalog Co.
6. Arkwright, J. A. 1921. Variation in bacteria in relation to agglutination both by salts and by specific serum. *J. Path. Bact.* 24:36–60.
7. Griffith, F. 1923. The influence of immune serum on the biological properties of pneumococci. *Rep. Public Health Med. Subj.* 18:1–13.
8. Griffith, F. 1928. The significance of pneumococcal types. *J. Hygiene* 27:113–159.
9. Dawson, M. H. 1930. The transformation of pneumoccal types. *J. Exp. Med.* 51:123–147.
10. Dawson, M. H. & Sia, R. H. P. 1931. In vitro transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* 54:701–710.
11. Alloway, J. L. 1932. The transformation in vitro of R pneumococci into S forms of different specific types by use of filtered pneumococcus extracts. *J. Exp. Med.* 55:91–99.
12. McCarty, M. 1985. *The Transforming Principle: Discovering That Genes Are Made of DNA.* Norton.
13. Avery, O. T., MacLeod, C. M., & McCarty, M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* 79: 137–158.
14. Chargaff, E. 1950. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymic degradation. *Experentia* 6:201–209.
15. Hershey, A. D. & Chase, M. 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36:39–56.

SINOPSIS

Los cromosomas son portadores de información genética. Las primeras observaciones condujeron a los biólogos a considerar el papel genético de los cromosomas. Estas observaciones incluyen la precisión del reparto de cromosomas entre las células hijas durante la división celular; la comprobación de que los cromosomas de una especie permanecen constantes en forma y número de una división celular a la siguiente; el dato de que el desarrollo embrionario requiere un conjunto en particular de cromosomas, y la observación de que el número de cromosomas se divide a la mitad antes de la formación de los gametos y se duplica luego de la unión de un espermatozoide y un óvulo durante la fecundación. Los datos de Mendel suministraron a los biólogos nuevos criterios para identificar a los portadores de los genes. Los estudios de Sutton acerca de la formación de gametos en el saltamontes revelaron la existencia de cromosomas homólogos, la vinculación de homólogos durante la división celular que precede a la formación de gametos y la separación de los homólogos durante la primera división meiótica (pág. 389).

Si los genes están empaquetados juntos en los cromosomas transmitidos de padres a hijos, entonces los genes en los mismos cromosomas deben estar ligados uno con otro para formar grupos de ligamiento. La existencia de grupos de ligamiento se confirmó en varios sistemas, en particular en la mosca de la fruta en la que se observó que docenas de mutaciones pueden ordenarse en cuatro grupos unidos que corresponden a tamaño y número en los cromosomas presentes en las células de estos insectos. Al mismo tiempo, se descubrió que la unión era incompleta, es decir, los alelos que de manera original están presentes en un cromosoma determinado no permanecen juntos en todos los casos durante la formación de los gametos, sino que se someten a una distribución aleatoria entre los homólogos paternos y maternos. Se propuso que este fenómeno, al cual Morgan denominó entrecruzamiento, se debe al rompimiento y unión de segmentos de cromosomas homólogos que ocurrían cuando los homólogos se relacionaban durante la primera división meiótica. El análisis de descendientes por apareamiento entre adultos y portadores de un tipo de mutación sobre el mismo cromosoma indica que la frecuencia de recombinación entre dos genes suministra una medida de la distancia relativa que separa a estos dos genes. Por lo tanto, se puede usar la frecuencia de recombinaciones para preparar mapas detallados de series ordenadas de genes a lo largo de cada cromosoma en una especie. El mapa genético de la mosca de la fruta, basado en la frecuencia de recombinaciones, se comprobó de manera independiente mediante el examen de la localización de diferentes bandas en el cromosoma politeno gigante observado en ciertos tejidos larvarios de estos insectos (pág. 391).

Los experimentos analizados en la sección Vías experimentales suministran datos concluyentes acerca de que el DNA es material genético. El DNA es una molécula helicoidal con dos cadenas de nucleótidos que discurren en direcciones opuestas con esqueleto central exterior y las bases nitrogenadas hacia adentro. Los nucleótidos de una cadena que contienen adenina son complementarios de los nucleótidos de la otra cadena que contienen timina, y del mismo modo para los nucleótidos que poseen guanina y citosina. Como resultado, las dos cadenas de una molécula de DNA son complementarias entre sí. La información genética está codificada en la secuencia lineal específica de los nucleótidos que constituyen las cadenas. El modelo de Watson-Crick de la estructura del DNA sugirió un mecanismo de replicación, incluidos la separación de las cadenas y el uso de cada una como plantilla para dirigir el orden de ensamblado de los nucleótidos durante la construcción de la cadena complementaria. El mecanismo por el cual el DNA regía el ensamblado de una proteína específica permanecía en misterio absoluto. La molécula de DNA mostrada en la figura 10-10 es un estado relajado que tiene 10 pares de bases por vuelta de la hélice. Dentro de la célula, el DNA tiende a subenrollarse (con menor número de pares de base por vuelta) y se dice que muestra superenrollamiento negativo, estado que facilita la separación de las cadenas durante la replicación y transcripción. El estado de superenrollamiento del DNA puede alterarse por acción de las topoisomerasas, enzimas capaces de cortar, reordenar y de nueva cuenta unir las cadenas de DNA (pág. 395).

Toda la información genética presente en un solo conjunto haploide de los cromosomas de un organismo constituye el genoma del organismo. La variedad de secuencias del DNA que forman el genoma y el número de copias de esas secuencias diferentes describen su complejidad. El conocimiento de la complejidad del genoma procede de los primeros estudios que mostraron una molécula de DNA constituida por dos cadenas que se pueden separar por calor; cuando la temperatura de la solución desciende, las cadenas complementarias sencillas vuelven a unirse para formar la doble cadena de las moléculas estables de DNA. El análisis de la cinética de este proceso de renaturalización suministra una medida de la concentración de secuencias complementarias, que a su vez indica la variedad de secuencias presentes en una cantidad determinada de DNA. Cuanto mayor sea el número de copias de una secuencia particular en el genoma, mayor es su concentración y más rápida su renaturalización (pág. 402).

Cuando se reconstruyen fragmentos de DNA procedentes de células eucariotas, la curva muestra de ordinario tres pasos distintos que corresponden a la renaturalización de tres diferentes tipos de secuencias de DNA. La fracción altamente repetida consta de secuencias de DNA cortas repetidas en gran número e incluyen DNA satélite situado en el centrómero de los cromosomas, DNA minisatélite y DNA microsatélite. Estos últimos dos grupos tienden a ser muy variables, causan ciertas enfermedades hereditarias y constituyen la base de las técnicas de huellas de DNA. La fracción moderadamente repetida incluye secuencias de DNA que codifican RNA ribosomal y de transferencia y proteínas de histona, así como varias secuencias con funciones no codificantes. La fracción no repetida contiene genes codificantes de proteínas, de los cuales sólo hay una copia por conjunto haploide de cromosomas (pág. 403).

La organización de la secuencia del genoma es capaz de cambiar, ya sea con lentitud en el curso de la evolución o con rapidez a consecuencia de una transposición. Los genes eucariotas que codifican proteínas casi siempre son miembros de una familia de multigenes, cuyos elementos evidencian datos de una evolución originada en un gen ancestral común. Se cree que el primer paso en este proceso es la duplicación de un gen, la mayor parte de las veces quizá por el fenómeno de entrecruzamiento desigual. Una vez ocurrida la duplicación, sería de esperar que la sustitución de nucleótidos modifique a varios miembros en diferentes formas y produzca una familia de secuencias repetidas con estructura similar pero no idéntica. Por ejemplo, los genes de globina están formados con los grupos de genes localizados en dos cromosomas distintos. Cada grupo contiene varios genes relacionados que codifican polipéptidos de globina empleados en diversas etapas de la vida del animal. Los grupos también contienen seudogenes, homólogos de los genes de globina, pero sin función (pág. 409).

Ciertas secuencias de DNA son capaces de moverse con rapidez de un lugar a otro en el genoma por un mecanismo llamado transposición. Estos elementos transponibles se conocen como transposones y son capaces de integrarse por sí mismos de forma aleatoria

a través del genoma. Los transposones mejor estudiados se encuentran en bacterias. Se caracterizan por secuencias invertidas repetidas en sus extremos terminales, un segmento interno que codifica a una transposasa requerida para su integración y la formación de secuencias repetidas cortas en el DNA blanco que flanquea al elemento en el sitio de integración. Los elementos eucariotas susceptibles de cambiar de sitio pueden desplazarse mediante varios mecanismos. En la mayor parte de los casos, el elemento se transcribe a un RNA, que puede ser copiado por una transcriptasa inversa codificada por elemento, y el DNA copiado se integra en el sitio específico. La fracción moderadamente repetida del DNA contiene dos grandes familias de elementos transponibles, la familia *Alu* y la L1 (pág. 411).

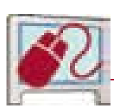
En la década pasada, más de un centenar de diferentes genomas se han secuenciado. Estos esfuerzos han generado un importante hecho en el ordenamiento y la evolución, ya sea de los componentes del genoma que codifican a proteínas o de aquellos que no codifican. El genoma humano contiene sólo alrededor de 25 000 genes que codifican proteínas, pero muchos más polipéptidos pueden sintetizarse como resultado de actividades de amplificación de genes, como el procesamiento alternativo. Es posible obtener información acerca de los elementos funcionales del genoma humano comparando la secuencia con secciones homólogas de otros genomas para determinar cuáles porciones están conservadas y cuáles tienden a sufrir diversificaciones en su secuencia. Se supone que las secuencias conservadas tienen una función, sea la de codificar o la de regular. Los genomas del chimpancé y del ser humano difieren en alrededor de 4%. Comparar secuencias en los dos genomas proporciona información acerca de genes que han sido sometidos a selección positiva en el linaje humano y subyacen a algunas de las características únicas del ser humano (pág. 415).

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. ¿En qué habrían diferido los resultados de Mendel si dos de los siete rasgos estudiados los codificaran genes situados uno cerca del otro sobre alguno de los cromosomas de las plantas del guisante?
2. Sutton pudo suministrar datos visuales de la ley de segregación de Mendel. ¿Por qué era imposible para él confirmar o refutar la ley de la permutación independiente de Mendel?
3. Los genes X, Y y Z se localizan en el mismo cromosoma. Registre en un mapa sencillo el orden de los genes y la distancia relativa entre los genes X, Y y Z a partir de los datos siguientes:

Frecuencia de entrecruzamiento	*Entre estos genes*
36%	X-Z
10%	Y-Z
26%	X-Y

4. Los alelos situados sobre extremos opuestos de un cromosoma tienen tal probabilidad de separarse durante el entrecruzamiento que pueden hacerlo de manera independiente. ¿Cómo es posible determinar mediante cruzamiento genético si estos dos genes pertenecen al mismo grupo unido?, ¿cómo podría establecerse esto mediante la hibridación de ácidos nucleicos?
5. ¿Qué puntos de la figura 10-17 se observarían en la renaturalización del DNA que codifica RNA ribosomal? Suponga que tiene una preparación pura de fragmentos de DNA cuyas secuencias codifican RNA ribosomal. Trace la renaturalización de este DNA superpuesta a la curva del DNA total mostrada en la figura 10-17.
6. Cerca de 5% del genoma humano consiste en la actualidad de duplicaciones de segmentos que han evolucionado en los pasados 35 millones de años. ¿Cómo supone usted que los investigadores son capaces de estimar cuándo se duplicó una región particular de un cromosoma?
7. En la página 412 se afirmó que al menos 45% del genoma humano deriva de elementos transponibles. El número actual podría ser mucho mayor, pero es imposible hacer una determinación aproximada del origen de muchas otras secuencias. ¿Por qué supone usted que es difícil hacer tales afirmaciones acerca del origen de muchas de las secuencias del genoma humano?
8. Suponga que tiene dos soluciones de DNA, una de cadena sencilla y otra de doble cadena, con absorbancia de luz ultravioleta equivalente a 260 nm. ¿Cuál debería ser la concentración del DNA al comparar estas dos soluciones?
9. ¿Qué patrón de marcado sería esperable después de la hibridación in situ entre cromosomas mitóticos y RNA mensajero de mioglobina marcada y entre los mismos cromosomas y el DNA de la histona marcada?
10. De acuerdo con la composición de bases que determinó Chargaff, ¿cuál de las siguientes caracterizaría a cualquier muestra de DNA?: a) [A] + [T] = [G] + [C]; b) [A]/[T] = 1; c) [G] = [C]; d) [A] + [G] = [T] + [C]. Si el contenido de C de la preparación de una doble cadena del DNA es de 15%, ¿cuál sería el contenido de A?
11. Si 30% de las bases de una cadena sencilla de DNA es T, entonces 30% de las bases de las cadenas es A. ¿Es cierto o falso?, ¿por qué?
12. ¿Concuerda usted con la afirmación según la cual T_m representa la temperatura en la cual 50% de las moléculas de DNA en una solución es de cadena única?
13. Asuma que encuentra un primate con un gen de la globina beta con una sola secuencia interpuesta. ¿Piensa que este animal pudo evolucionar de un ancestro primitivo que se separó de otros animales antes de la aparición del segundo intrón?
14. En 1996 se publicó un informe en *Lancet* sobre el nivel de expansión de trinucleótidos en el DNA de los donantes de sangre. Estos investigadores encontraron que el nivel de expansión de los trinucleótidos disminuyó en grado significativo con la edad. ¿Puede proporcionar alguna explicación a estos hallazgos?
15. Suponga que usted busca un SNP específico en el genoma donde la mitad de la población tiene una adenina (A) y la otra mitad tiene una guanina (G). ¿Existe alguna manera de determinar cuáles de estas variantes estaban presentes en seres humanos ancestrales y cuáles se hicieron frecuentes durante la evolución humana?



SITIO EN INTERNET www.wiley.com/college/karp

Las animaciones y los videos indicados en este capítulo pueden visitarse en el sitio de Cell and Molecular Biology de Karp en Internet. También hallará todas las respuestas a las preguntas analíticas recién planteadas, autoexámenes que le ayudarán a prepararse para los exámenes, y vínculos con fascinantes recursos. La sección lecturas adicionales que sigue se amplía en el sitio en Internet.

LECTURAS ADICIONALES

Balter, M. 2005. Are humans still evolving? *Science* 309:234–237.

Bates, A. D. 2006. DNA topoisomerases: single gyrase caught in the act. *Curr. Biol.* 16:R204–R206.

Bell, C. G., et al. 2005. The genetics of human obesity. *Nature Revs. Gen.* 6:221–234.

Biémont, C. & Vieira, C. 2006. Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443:521–524.

Cantor, C. R. & Nelson, M. R. 2005. Haplotyping in biomedicine—practical challenges. *Nature Biotech.* 23:21–22.

Cattaneo, E., et al. 2002. The enigma of Huntington's disease. *Sci. Am.* 287:92–97. [Dec.]

Check, E. 2005. Patchwork people. *Nature* 437:1084–1086. [variaciones estructurales en seres humanos.]

Cozzarelli, N. R., et al. 2006. Giant proteins that move DNA: bullies of the genomic playground. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 7:580–588. [sobre topoisomerasas.]

Daiger, S. P. 2005. Was the Human Genome Project worth the effort? *Science* 308:362–363.

Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Revs. Gen.* 5:435–445.

Feuk, L., et al. 2006. Structural variation in the human genome. *Nature Revs. Gen.* 7:85–97.

Fisher, S. E. & Marcus, G. F. 2006. The eloquent ape: genes, brains and the evolution of language. *Nature Revs. Gen.* 7:9–20.

Gunter, C., et al. 2004. Nature insight: Human genomics and medicine. *Nature* 429:439–481.

International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431:931–945.

Kaiser, J. 2006. NIH goes after whole genome in search of disease genes. *Science* 311:933.

Kazazian, H. H., Jr. 2004. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303:1626–1632.

Klug, A. 2004. Historical perspective: the discovery of the DNA double helix. *J. Mol. Biol.* 335:3–26.

Marx, J. 2005. Huntington's research points to possible new therapies. *Science* 310:43–45.

Nadeau, J. H. & Lee, C. 2006. Copies count. *Nature* 439:798–799. [sobre polimorfismo de número de copias.]

Panopoulou, G. & Poustka, A. J. 2005.Timing and mechanism of ancient vertebrate genome duplications—the adventure of a hypothesis. *Trends Gen.* 21:559–567.

Pearson, C. E., et al. 2005. Reviews on nucleotide repeat instability. *Nature Revs. Gen.* 6, #10.

Pennisi, E. 2006. DNA's molecular gymnastics. *Science* 312:1467–1468. [sobre formas no B de DNA.]

Ponting, C. P. & Lunter, G. 2006. Human brain gene wins genome race. *Nature* 443:149–150.

Royal, C. D. M., et al. 2004. Reviews on human race and genetic variation. *Nature Gen.* (Nov. Supplement) 36:S5–S47.

Ruvolo, M. 2004. Comparative primate genomics: the year of the chimpanzee. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 14:650–656.

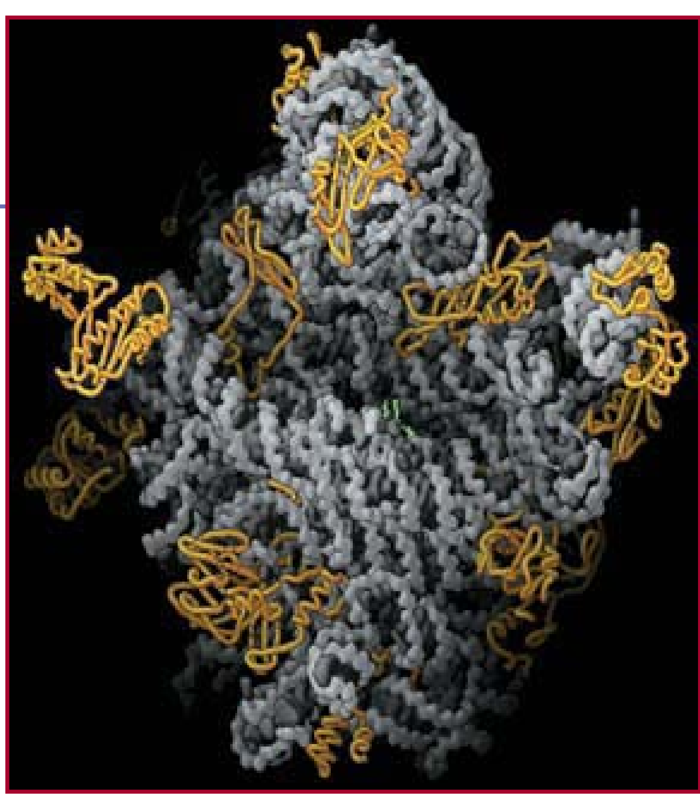
Sabeti, P. C. 2006. Positive natural selection in the human lineage. *Science* 312:1614–1620.

Schlötterer, C. 2004. The evolution of molecular markers—just a matter of fashion? *Nature Revs. Gen.* 5:63–69.

Seeman, N. C. 2004. Nanotechnology and the double helix. *Sci. Amer.* pp. 64–75. [June.]

Stein, L. D. 2004. End of the beginning. *Nature* 431:915–916. [sobre la secuencia del genoma humano.]

Winchester, G. 2003. 50 years before the double helix. *Curr. Biol.* 13:R747–R749. [primeros descubrimientos sobre los cromosomas como portadores de genes.]



Expresión del material genético: de la transcripción a la traducción

En muchos aspectos, el progreso de la biología en el siglo pasado se refleja en el cambio del concepto de gen. Como resultado del trabajo de Mendel, los biólogos aprendieron que los genes son elementos discretos que dominan la apariencia de rasgos específicos. De haber tenido la oportunidad, Mendel habría argumentado a favor del concepto de que un gen determina un rasgo. Boveri, Weismann, Sutton y sus contemporáneos descubrieron que los genes y su representación física formaban parte de los cromosomas. Morgan, Sturtevant y sus colegas demostraron que los genes tienen una localización específica (se hallan en lugares determinados de cromosomas particulares y esta localización permanece constante de un individuo a otro). Griffith, Avery, Hershey y Chase demostraron que los genes están compuestos de DNA (ácido desoxirribonucleico), y Watson y Crick resolvieron el problema de la estructura del DNA, lo que explicaba de qué manera esta macromolécula podía codificar información heredable.

A pesar de que la formulación de estos conceptos fue un paso importante en la comprensión de la genética, ninguno de éstos define el mecanismo por medio del cual la información almacenada en un gen se convierte en el trabajo que dirige las actividades celulares. Éste es el tema principal que se analiza en esta sección. Primero se describen las propiedades del gen y después su función en la expresión de los caracteres hereditarios. ●

Modelo de la subunidad grande de un ribosoma procariota a una resolución de 2.4 Å mediante cristalografía de rayos X. Esta vista se enfoca en el espacio del sitio activo de la subunidad grande que consiste por entero en RNA. El RNA aparece en gris, la proteína en dorado y el sitio activo se reconoce por la unión de un inhibidor (en verde). (CORTESÍA DE THOMAS A. STEITZ, YALE UNIVERSITY.)

11.1 RELACIÓN ENTRE GENES Y PROTEÍNAS

En 1908 el médico escocés Archibald Garrod señaló que los síntomas observados en personas afectadas por ciertas enfermedades hereditarias raras eran efecto de la ausencia de enzimas específicas; este fue el primer hallazgo importante de la función de un gen. Uno de los trastornos que investigó Garrod fue la *alcaptonuria*, un padecimiento fácil de diagnosticar por el color oscuro que adquiere la orina cuando se expone al aire. Garrod observó, en personas con alcaptonuria, la ausencia en la sangre de una enzima que oxida el ácido homogentísico, compuesto formado durante el procesamiento de los aminoácidos fenilalanina y tirosina. El ácido homogentísico acumulado se excreta por la orina y le confiere una tonalidad oscura al oxidarse por el aire. Garrod había descubierto la relación entre un gen, una enzima y una enfermedad metabólica específicos. Denominó a estas enfermedades "errores innatos del metabolismo". Tal y como ocurrió con otras observaciones tempranas cruciales en genética, los descubrimientos de Garrod se ignoraron durante décadas.

En 1940, George Beadle y Edward Tatum, del *California Institute of Technology*, resucitaron la idea de que los genes controlaban la producción de enzimas. Estos investigadores estudiaron la *Neurospora*, un moho tropical del pan que en condiciones normales puede crecer en medios muy simples con una sola fuente de carbono orgánico (p. ej., un azúcar), sales inorgánicas y biotina (una vitamina del complejo B). Puesto que sus necesidades para vivir son mínimas, debía tener capacidad para sintetizar todos los metabolitos requeridos. Beadle y Tatum razonaron que un organismo con capacidad de síntesis tan amplia debía ser muy sensible a diferencias enzimáticas, fáciles de descubrir mediante el protocolo experimental apropiado. En la figura 11-1 se muestra el protocolo simplificado que se utilizó.

En esencia, el plan de Beadle y Tatum consistía en radiar las esporas del moho y analizarlas en busca de mutaciones que causaran la alteración de alguna enzima. Para detectar estas mutaciones investigaron la capacidad de las esporas radiadas para crecer en *medio mínimo*, sin los componentes esenciales que debía sintetizar el propio organismo (fig. 11-1). Si una espora era incapaz de crecer en medio mínimo, pero crecía en medio de cultivo suplementado con alguna coenzima particular (p. ej., ácido pantoténico de coenzima A), entonces los investigadores podían concluir que las células portaban una deficiencia enzimática que impedía que tales células sintetizaran estos compuestos esenciales.

Beadle y Tatum radiaron primero a miles de células. Dos de dichas células perdieron su capacidad de crecer en un medio mínimo: una necesitó piridoxina (vitamina B_6) y la otra tiamina (vitamina B_1). Por último, se investigó la descendencia de casi 100 000 esporas radiadas y se aisló a docenas de diferentes tipos

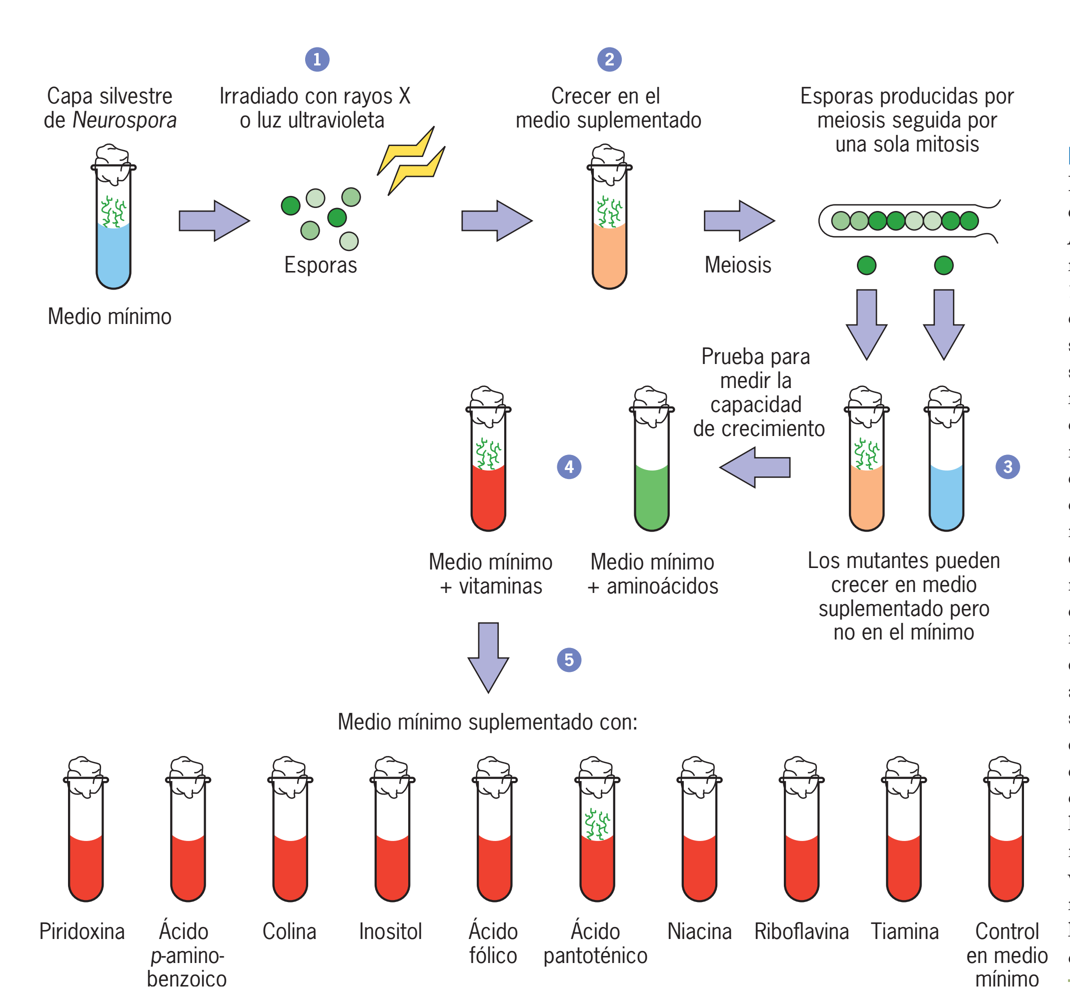


FIGURA 11-1 El experimento de Beadle-Tatum para la separación de mutantes genéticos en *Neurospora*. Las esporas se radiaron para inducir mutaciones (paso 1) y se permitió que las colonias crecieran en tubos con medio suplementado (paso 2). Después se probó la capacidad de las esporas individuales producidas por las colonias para crecer en un medio mínimo (paso 3). Aquellas que no crecieron eran mutantes y la tarea consistía en identificar al gen mutante. En el ejemplo mostrado en el paso 4 se encontró que una muestra de las células mutantes crecía en el medio mínimo suplementado con vitaminas, pero no en el medio suplementado con aminoácidos. Esta observación señala una deficiencia en una enzima que ayuda a la formación de una vitamina. En el paso 5, el crecimiento de estas mismas células en un medio mínimo suplementado con una u otra de las vitaminas indica que la deficiencia reside en un gen que participa en la formación del ácido pantoténico (parte de la coenzima A).

de mutantes. Cada mutante poseía un gen y por tanto presentaba una deficiencia enzimática que impedía a la célula catalizar una reacción metabólica particular. Los resultados fueron claros: un gen específico portaba información para elaborar una enzima particular. Esta conclusión se conoció como la hipótesis de "un gen-una enzima". Con posterioridad, cuando se descubrió que las enzimas se componen por lo general de más de una cadena de polipéptidos, cada una codificada por un gen distinto, el concepto se denominó "un gen-un polipéptido". Si bien esta relación se aproximó mucho más a la función básica de un gen, tuvo que modificarse debido al descubrimiento de que un solo gen genera con frecuencia varios polipéptidos vinculados como resultado del procesamiento (*splicing*) alternativo (discutido en la sección 12.5).

¿Cuál es la naturaleza molecular del defecto en una proteína por una mutación genética? La respuesta a esta pregunta surgió en 1956, cuando Vernon Ingram de la *Cambridge University* publicó la consecuencia molecular de la mutación que causa la anemia de las células falciformes. La hemoglobina posee cuatro grandes polipéptidos. Pese a que estas moléculas eran muy grandes para secuenciarlas con la tecnología de esa época, Ingram ideó una forma de hacerlo. Por medio de la enzima proteolítica tripsina escindió en varios fragmentos específicos preparados de hemoglobina normal y hemoglobina de células falciformes. Entonces analizó estos fragmentos peptídicos mediante cromatografía en papel para determinar si eran diferentes algunos de los productos de la digestión por tripsina de la hemoglobina normal y las células falciformes. De los 30 péptidos o más presentes en la mezcla, uno migró de manera diferente en las dos preparaciones; en apariencia, esta única diferencia fue la causante de todos los síntomas relacionados de la enfermedad. Una vez que se separaron los péptidos, Ingram tenía sólo un pequeño fragmento para secuenciar en lugar de la proteína completa. La diferencia observada fue la sustitución de una valina en la hemoglobina de las células falciformes por un ácido glutámico de la molécula normal. Ingram había demostrado que una mutación en un solo gen podía causar una sustitución aminoacídica en la secuencia de un polipéptido.

Revisión del tránsito de la información dentro de las células

Hasta aquí se ha establecido la relación entre información genética y secuencia de aminoácidos, pero este conocimiento por sí solo no proporciona indicios acerca del mecanismo para generar cadenas de polipéptidos específicas. Según se sabe ahora, existe un intermediario entre un gen y su polipéptido, el **RNA mensajero** (ácido ribonucleico mensajero, **mRNA**). El descubrimiento del mRNA lo realizaron en 1961 François Jacob y Jacques Monod del *Instituto Pasteur* en París, Sydney Brenner de la *University of Cambridge* y Matthew Meselson del *California Institute of Technology*. Un RNA mensajero se ensambla como una copia complementaria de una de las dos cadenas de DNA que constituyen un gen. La síntesis de un RNA a partir de un DNA molde se llama **transcripción.** Esta secuencia de nucleótidos es complementaria de la del gen a partir del cual se transcribió, por lo que el mRNA tiene la misma información contenida en el propio gen. En la figura 11-2 se muestra una revisión de la función del RNA mensajero y su participación en el tránsito de la información en la célula eucariota.

El uso de un RNA mensajero permite a la célula separar información almacenada de la información utilizada. Mientras el gen permanece almacenado, aislado dentro del núcleo como parte de una enorme molécula inmóvil de DNA, puede transmitir su información a un ácido nucleico movible mucho más pequeño capaz de llegar al citoplasma. Una vez en el citoplasma, el mRNA puede servir como molde para controlar la incorporación de aminoácidos en el orden específico codificado por la secuencia de nucleótidos del DNA y el mRNA. El uso del RNA mensajero también permite a la célula incrementar de manera considerable su actividad. Una molécula de DNA puede servir como molde en la formación de muchas moléculas de mRNA, cada una de las cuales puede usarse para la síntesis de gran número de cadenas de polipéptidos.

Las proteínas se sintetizan en el citoplasma por un proceso complejo conocido como **traducción**. Ésta requiere la participación de docenas de componentes diferentes, incluidos los

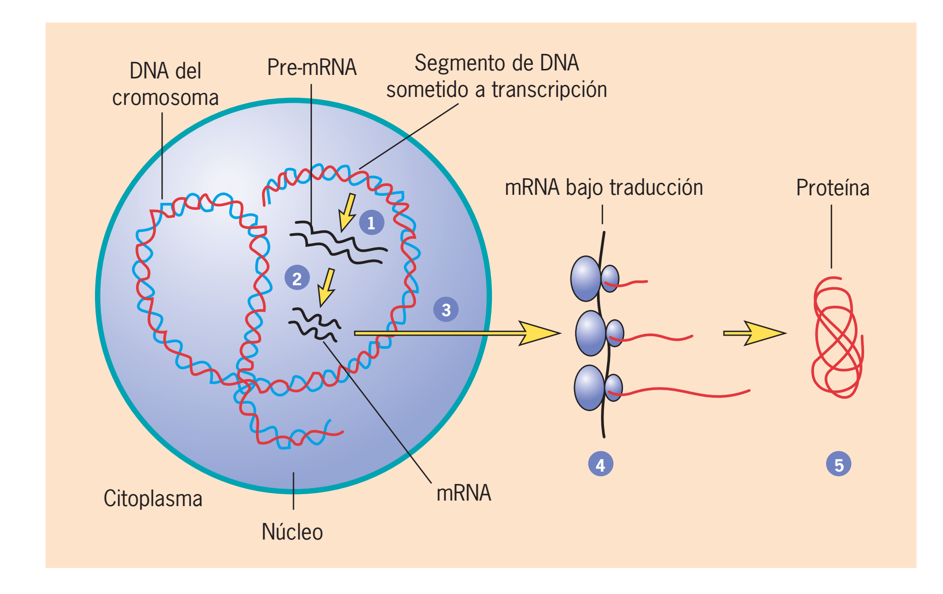


FIGURA 11-2 Revisión del flujo de información en una célula eucariota. El DNA de los cromosomas localizados dentro del núcleo contiene toda la información genética almacenada. Los sitios seleccionados del DNA se transcriben en pre-mRNA (paso 1) y se procesan en RNA mensajeros (paso 2). Los RNA mensajeros se desplazan fuera del núcleo (paso 3) hacia el citoplasma, donde los ribosomas que se mueven a lo largo del mRNA (paso 4) los traducen en polipéptidos. Después de la traducción, el polipéptido se pliega para adquirir su conformación nativa (paso 5).

ribosomas. Estos últimos son componentes inespecíficos de la maquinaria de traducción. Tales complejos citoplásmicos pueden programarse como "máquinas", como una computadora, para traducir la información codificada por cualquier RNA mensajero. Los ribosomas contienen proteínas y RNA. Los RNA de un ribosoma se conocen como **RNA ribosomales** (o **rRNA**) y, del mismo modo que los RNA mensajeros, cada uno se transcribe a partir de las cadenas de DNA de un gen. En lugar de funcionar como portadores de información, los rRNA reconocen y unen otras moléculas, proveen apoyo estructural y catalizan las reacciones químicas por medio de las cuales los aminoácidos se unen de manera covalente. Los **RNA de transferencia** (o **tRNA**) constituyen otro tercer grupo importante de RNA que se requiere durante la síntesis de proteínas. Los RNA de transferencia son necesarios para traducir la información codificada en los nucleótidos del mRNA en el "alfabeto" de aminoácidos de un polipéptido.

Los rRNA y los tRNA deben su actividad a sus complejos secundarios y estructuras terciarias. A diferencia del DNA, que siempre tiene una estructura que semeja una doble hélice sin importar cuál sea la fuente de donde provenga, muchos RNA adoptan formas tridimensionales complejas por medio del plegamiento, estructuras que son muy diferentes de un tipo de RNA a otro. En consecuencia, al igual que las proteínas, los RNA pueden efectuar diversas funciones debido a que adoptan gran variedad de formas. Como en las proteínas, el plegamiento de las moléculas de RNA sigue ciertas reglas. Así como la función principal del plegamiento de proteínas es cubrir residuos hidrófobos en su interior, una regla importante del plegamiento del RNA es integrar regiones que formen pares de bases complementarios (fig. 11-3). Como se observa en la figura 11-3, las regiones de bases apareadas forman por lo general dobles cadenas (y dobles hélices) como "tallos", los cuales están conectados por "asas" de cadena sencilla. A diferencia del DNA, el cual consiste exclusivamente en cadenas que forman pares de bases Watson-Crick (G-C, A-T), los RNA contienen a menudo pares de bases que no son comunes (recuadro, fig. 11-3) y bases nitrogenadas modificadas. Estas regiones de la molécula, que no son convencionales, sirven como sitios de reconocimiento para proteínas y otros RNA promueven el plegamiento del RNA y ayudan a estabilizar estructuras de la molécula. La importancia de la complementariedad entre pares de bases se extiende más allá del tRNA y la estructura del rRNA. Como se advierte a lo largo de este capítulo, el apareamiento de bases *entre* moléculas de RNA tiene una función central en la mayoría de las actividades en las que intervienen los RNA.

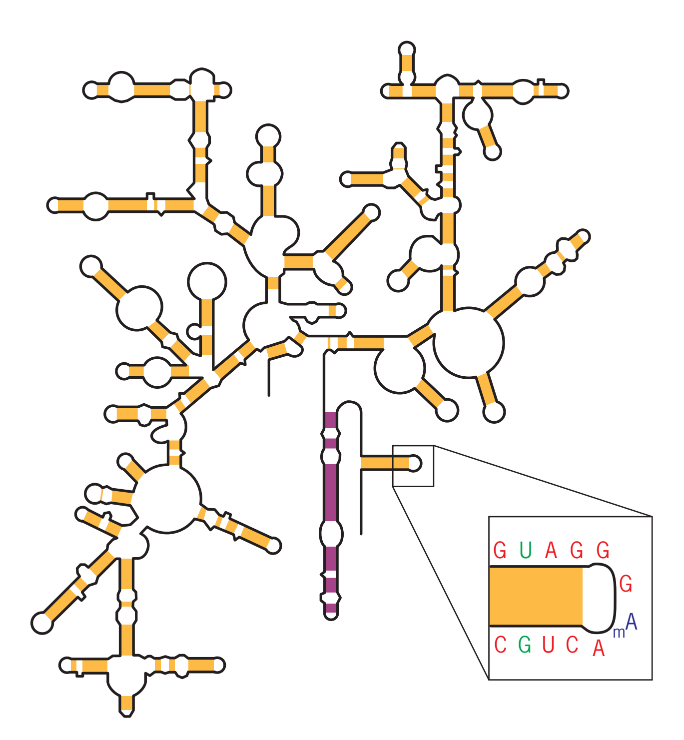


FIGURA 11-3 **Estructura bidimensional de un RNA ribosomal bacteriano** que muestra la extensa complementariedad de bases entre regiones diferentes de la cadena sencilla. La sección amplificada evidencia la secuencia de bases de un tallo y asa, incluidos un apareamiento de bases no convencional (G-U) y un nucleótido modificado, la metiladenosina. Una de las hélices aparece con diferente sombreado porque juega un papel esencial en la función del ribosoma, como se discute en la página 472. En la figura 11-43*b* se muestra un ejemplo de la estructura tridimensional de un RNA.

Las funciones del RNA mensajero, RNA ribosomales y tRNA se exploran con detalle en las siguientes secciones de este capítulo. Las células eucariotas contienen otros RNA que también poseen funciones vitales en el metabolismo celular; éstas incluyen RNA nucleares pequeños (snRNA), RNA nucleolares pequeños (snoRNA), RNA de interferencia pequeños (siRNA) y micro-RNA (miRNA). Esta última clase de RNA se descubrió en fecha reciente, lo cual hace pensar, una vez más, que hay muchas actividades celulares de importancia que aún no se han reconocido. El genoma puede codificar cientos de estos pequeños micro-RNA y al momento se tiene muy poca idea de la función que realizan.

Para los conocimientos generales sobre la estructura del RNA puede revisarse la página 75.

REVISIÓN ?

1. ¿Cómo lograron Beadle y Tatum concluir que un gen codifica a una enzima específica?
2. ¿De qué forma Ingram determinó la sustitución aminoacídica en la hemoglobina de individuos con anemia de células falciformes sin secuenciar la proteína por completo?

11.2 SINOPSIS DE LA TRANSCRIPCIÓN EN CÉLULAS PROCARIOTAS Y EUCARIOTAS

La transcripción es un proceso en el cual una cadena de DNA provee la información para la síntesis de una cadena de RNA. Las enzimas encargadas de la transcripción en células procariotas y eucariotas se denominan **polimerasas de RNA dependientes de DNA**, o tan sólo **polimerasas de RNA**. Estas enzimas incorporan nucleótidos, uno a la vez, dentro de una

cadena de RNA cuya secuencia es complementaria de una de las cadenas de DNA, la cual sirve como *plantilla* o *molde*.

El primer paso en la síntesis de un RNA es la vinculación de la polimerasa con el DNA molde. Esto plantea un tema de interés general, en este caso las interacciones específicas de dos moléculas muy diferentes, proteínas y ácidos nucleicos. Así como diferentes proteínas han evolucionado para unirse a diversos tipos de sustratos y catalizan distintos tipos de reacciones, también evolucionaron algunas para reconocer y unirse a secuencias específicas de nucleótidos en una cadena de ácido nucleico. El sitio de la molécula de DNA donde se une la polimerasa de RNA antes de iniciar la transcripción se llama **promotor**. Las polimerasas de RNA celulares no son capaces de reconocer los promotores por sí mismas y requieren la ayuda de proteínas adicionales conocidas como **factores transcripcionales**. Además de suministrar un sitio de enlace para la polimerasa, el promotor contiene la información que determina cuál de las dos cadenas de DNA se transcribe y el sitio en donde se inicia la transcripción.

La polimerasa se mueve a lo largo de la cadena de DNA molde hacia el extremo 5′ terminal (p. ej., en una dirección $3' \rightarrow 5'$). Conforme la polimerasa avanza, el DNA se desenrolla de manera temporal y la polimerasa ensambla una cadena complementaria de RNA que crece del extremo 5′ en una dirección a 3′ (fig. 11-4*a, b*). Como se indica en la figura 11-4*c*, la polimerasa de RNA cataliza la reacción

$$RNA_n + NPPP \rightarrow RNA_{n+1} + PP_i$$

en la cual precursores de trifosfato de ribonucleósido (NPPP) se hidrolizan en monofosfatos de nucleósidos cuando se polimerizan en una cadena por medio de enlaces covalentes. Las reacciones por las que se sintetizan ácidos nucleicos (y proteínas) se diferencian necesariamente de las reacciones llevadas a cabo en el metabolismo intermedio discutidas en el capítulo 3. En tanto que algunas de las reacciones que conducen a la formación de moléculas pequeñas, como los aminoácidos, pueden acercarse lo suficiente al equilibrio, con la posibilidad de medir una reacción inversa importante, las reacciones que llevan a la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas deben ocurrir en condiciones en las que no exista reacción inversa. Este fenómeno se ejemplifica durante la transcripción con la ayuda de una reacción secundaria:

$$PP_i \rightarrow 2\ P_i$$

catalizada por una enzima diferente, una pirofosfatasa. En este caso, el pirofosfato (PP_i) producido en la primera reacción se hidroliza en un fosfato inorgánico (P_i). La hidrólisis del pirofosfato genera gran cantidad de energía libre y torna a la incorporación del nucleótido irreversible.

A medida que la polimerasa se mueve a lo largo del DNA molde, éste incorpora nucleótidos complementarios dentro de la molécula del RNA en crecimiento. Un nucleótido se incorpora dentro de la cadena de RNA si es capaz de formar pares de bases (Watson-Crick) con el nucleótido de la cadena de DNA que se transcribe. Esto puede revisarse en la figura 11-4*c* en la que el 5′-trifosfato de adenosina entrante forma par con el nucleótido de timina que contiene el DNA molde. Una vez que la polimerasa se ha movido en un segmento en particular de DNA, la doble hélice de DNA se vuelve a formar (como se observa en la fig. 11-4*a*, *b*). Por consecuencia, la cadena de RNA no permanece vinculada con su molde como un híbrido DNA-RNA (excepto por unos nueve nucleótidos justo al lado del sitio donde la polimerasa opera). Las polimerasas de RNA son capaces de incorporar alrededor de 20 a 50 nucleótidos por segundo en una molécula de RNA y muchos genes en las células se transcriben de forma simultánea por cientos o más polimerasas (como se observa en la figura 11-11*c*). La micrografía electrónica en la figura 11-4*d* muestra una molécula de DNA de fago con diferentes moléculas de polimerasa de RNA unidas.

Las polimerasas de RNA son capaces de formar RNA muy largos. Por consiguiente, la enzima debe permanecer unida al DNA en largos segmentos del DNA molde (se dice que la enzima es *procesiva*). Al mismo tiempo, la enzima debe tener una vinculación lo suficientemente laxa para poder moverse de un nucleótido al siguiente de la plantilla (o molde). Mediante metodologías bioquímicas es difícil estudiar ciertas propiedades de las polimerasas de RNA, como la procesividad, debido a que tienden a promediar las diferencias entre moléculas proteicas individuales. Por lo tanto, los investigadores han desarrollado técnicas que hacen posible seguir las actividades de una sola molécula de polimerasa de RNA tal y como las empleadas para estudiar de modo individual los motores del citoesqueleto. Dos ejemplos de estos estudios se muestran en la figura 11-5. En estos ejemplos, una molécula de polimerasa de RNA está unida a la superficie de un cubreobjetos y se permite que transcriba una molécula de DNA que contiene unas pequeñas esferas fluorescentes unidas de manera covalente a uno de sus extremos. El movimiento de la esfera fluorescente puede seguirse por microscopia de fluorescencia.

En la figura 11-5*a*, la esfera está libre en solución y sus límites de movimiento son proporcionales a la longitud del DNA entre la polimerasa y la esfera. Conforme la polimerasa transcribe la plantilla, la cadena de DNA que conecta se elonga y el movimiento de la esfera se incrementa. Este tipo de sistema permite a los investigadores estudiar la velocidad de transcripción de una polimerasa individual y determinar si la polimerasa transcribe el DNA en un movimiento estable o discontinuo. En la figura 11-5*b*, la pelotita en el extremo de la molécula de DNA que se transcribe queda atrapada por un rayo láser (pág. 142). La poca fuerza desarrollada por el láser puede variarse lo suficiente para detener la transcripción continua del DNA de la polimerasa. Las medidas realizadas en moléculas de polimerasa de RNA durante la función de la transcripción indican que estas enzimas se pueden mover con una fuerza más de dos veces superior respecto de la molécula de miosina.

Aunque las polimerasas son moléculas relativamente poderosas, estas enzimas no se encuentran siempre en un estado de movimiento continuo, sino que pueden sufrir pausas en ciertos puntos a lo largo del DNA molde e incluso retroceder antes de reasumir su avance. En algunos casos, una polimerasa que permanece detenida debe digerir más allá del extremo 3′ de la transcripción sintetizada de manera reciente y sintetizar de nueva cuenta la porción errónea antes de reiniciar su movimiento. Se han identificado factores de elongación que aumentan la capacidad de la enzima para superar estos controles.

En este punto de la discusión es útil examinar las diferencias en el proceso de la transcripción entre las células procariotas y las eucariotas.

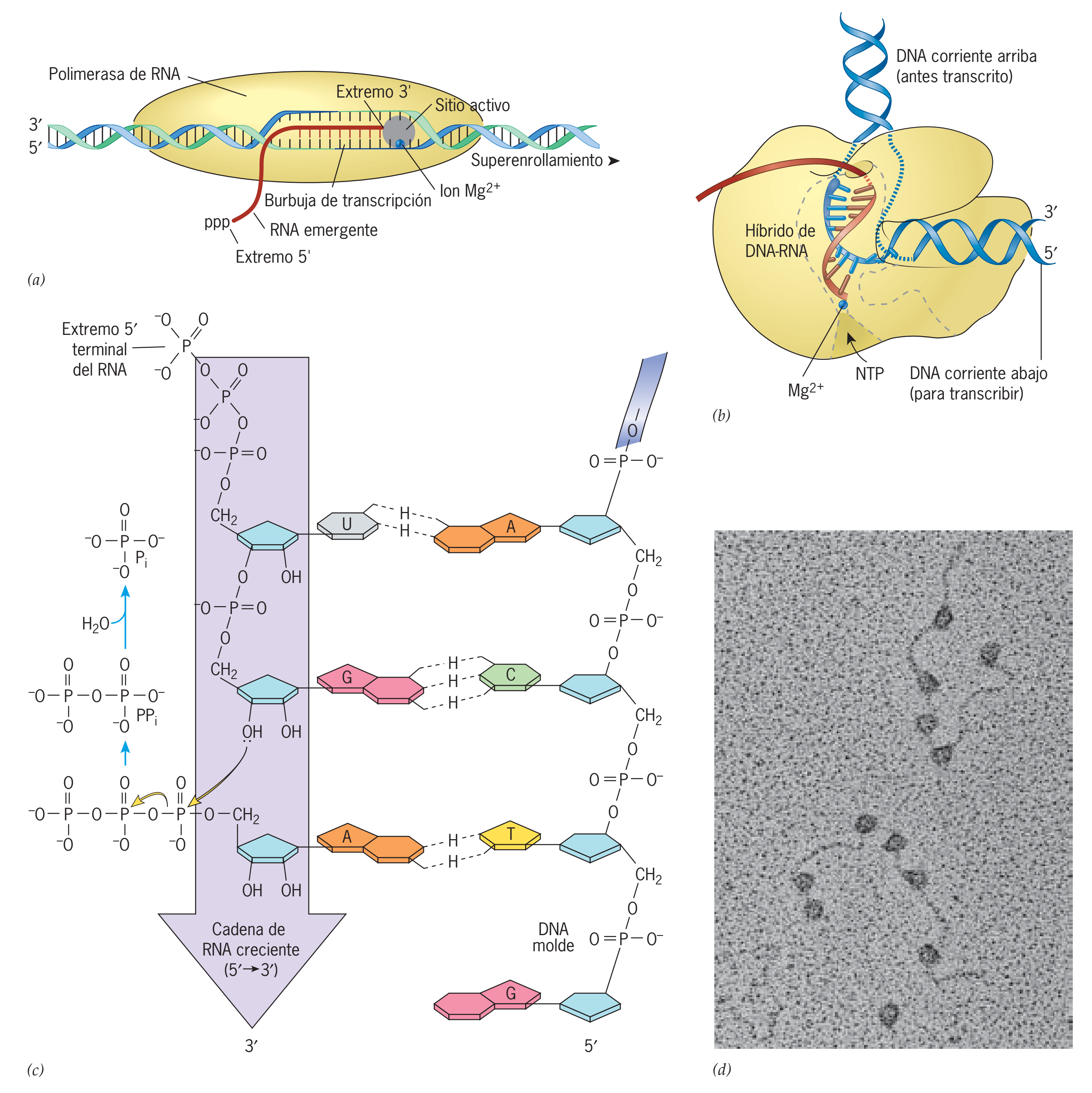
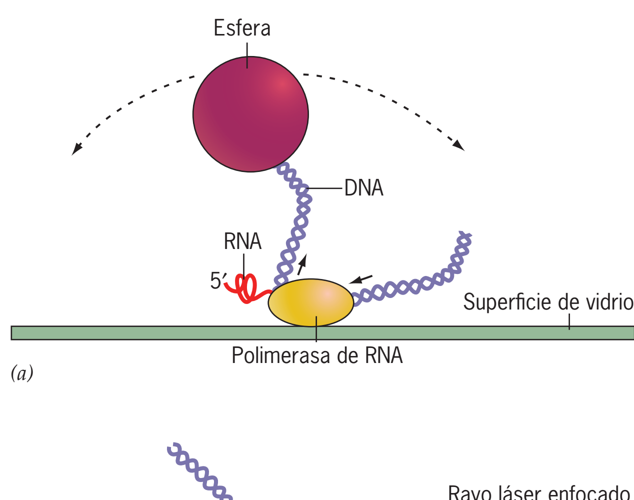


FIGURA 11-4 Alargamiento de la cadena durante la transcripción. *a*) Modelo esquemático del alargamiento de una molécula de RNA apenas sintetizada durante la transcripción. La polimerasa cubre alrededor de 35 pares de bases del DNA, la burbuja de transcripción compuesta de DNA de cadena sencilla (separada) contiene cerca de 15 pares de bases y el segmento presente en un híbrido DNA-RNA incluye más o menos nueve pares de bases. La enzima crea un superenrollamiento (superenrollamiento positivo) de DNA por delante de éste y un desenrollamiento (superenrollamiento negativo) de DNA por detrás (pág. 400). *b*) Modelo esquemático de una polimerasa de RNA en el momento de la elongación de la transcripción. El DNA corriente abajo permanece en un espacio dentro de la polimerasa, sujeto por un par de mandíbulas formadas por las dos subunidades mayores de la enzima. El DNA traza una vuelta pronunciada en la región del sitio activo, por lo que el DNA corriente arriba se extiende en la parte superior de este dibujo. El RNA naciente sale del sitio activo de la enzima a través de un canal separado. *c*) El alargamiento de la cadena ocurre como resultado de un ataque por el 3′ OH del nucleótido en el extremo de la cadena en crecimiento sobre el 5′ α-fosfato del trifosfato de nucleósido que se integra. El pirofosfato liberado después se corta y ello dirige la reacción hacia la polimerización. La geometría entre el apareamiento de bases entre el nucleótido de la cadena molde y el nucleótido que se integra determina cuál de los cuatro posibles trifosfatos de nucleósidos se incorpora en la cadena creciente de RNA en cada sitio. *d*) Micrografía electrónica de varias moléculas de polimerasa de RNA unidas a un DNA molde de un fago. (*D*, CORTESÍA DE R. C. WILLIAMS.)



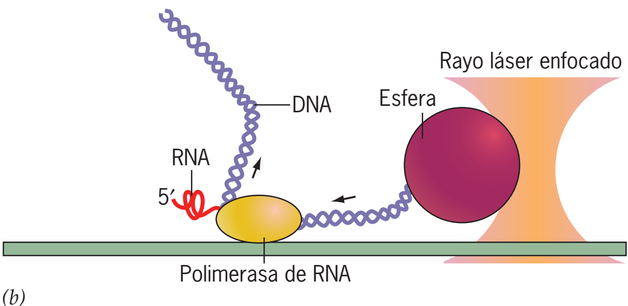


FIGURA 11-5 Ejemplos de técnicas experimentales para rastrear la actividad de una sola molécula de polimerasa de RNA. *a*) En este protocolo, la molécula de polimerasa de RNA está firmemente unida al portaobjetos y se permite que transcriba una molécula de DNA que contiene una esfera fluorescente en el extremo terminal corriente arriba. Las flechas indican el movimiento del DNA a través de la polimerasa. La velocidad del movimiento y el progreso de la polimerasa pueden rastrearse al observar la posición de la esfera en el tiempo, para lo cual se emplea un microscopio fluorescente. *b*) En este protocolo, la polimerasa unida transcribe una molécula de DNA con una esfera en su extremo terminal corriente abajo. Como en *a* las flechas indican la dirección del movimiento del DNA. La esfera queda atrapada en una trampa óptica (rayo láser), la cual ejerce una fuerza conocida que puede regularse al ajustar el rayo láser. Este tipo de aparato puede medir las fuerzas generadas por una polimerasa activa en transcripción. (Reimpresa a partir de J. Gelles y R. Landick, Cell 93:15, 1998, © 1998, con autorización de Elsevier Science.)

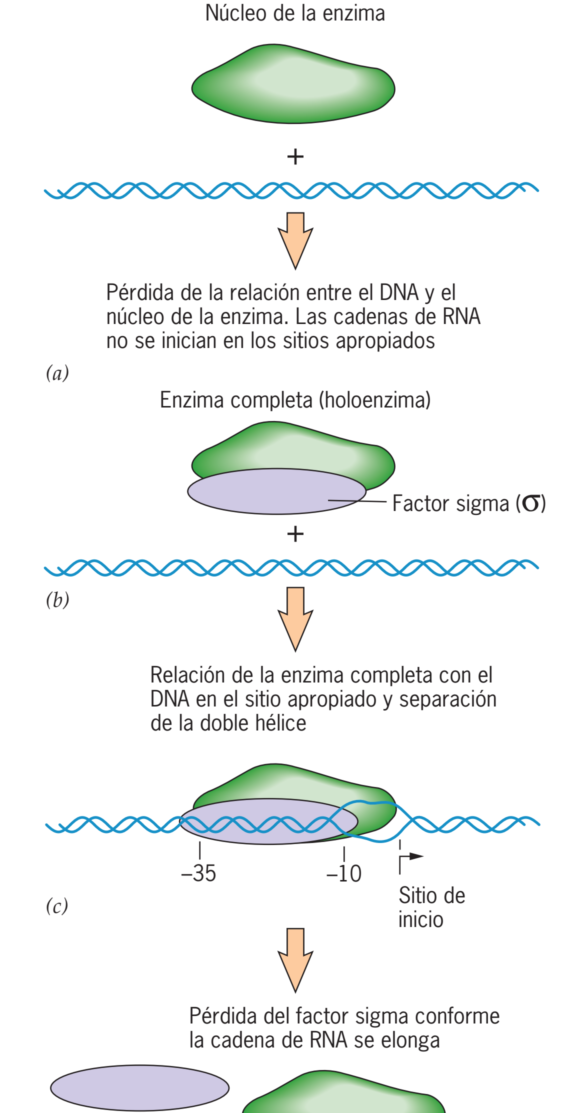


FIGURA 11-6 Representación esquemática del inicio de la transcripción en procariotas. *a*) En la ausencia del factor sigma, el núcleo de la enzima no puede interaccionar con el DNA en los sitios de inicio específicos. *b-d*) Cuando el núcleo de la enzima se relaciona con el factor sigma, la enzima completa es capaz de reconocer y unirse a la región promotora del DNA, separar las cadenas del DNA de doble hélice e iniciar la transcripción en el sitio de inicio apropiado (véase fig. 11-7). En el modelo tradicional ilustrado aquí, el factor σ se disocia de la enzima central, la cual es capaz de realizar la elongación transcripcional. Estudios recientes sugieren que σ podría permanecer unido a la polimerasa.

Transcripción en bacterias

Las bacterias, como *E. coli,* contienen un solo tipo de polimerasa de RNA compuesto de cinco subunidades en estrecha relación para formar un *núcleo enzimático.*[1] Si el núcleo de la enzima se purifica de las células bacterianas y agrega a una solución de moléculas de DNA bacteriano y trifosfatos de ribonucleósido, la enzima se une al DNA y sintetiza RNA. Sin embargo, las moléculas de RNA generadas por una polimerasa purificada no son las mismas que las halladas dentro de las células debido a que el núcleo de la enzima se une a sitios del DNA de manera aleatoria y éstos, en condiciones normales, se ignoran in vivo. No obstante, si un polipéptido accesorio purificado llamado *factor sigma* (σ) se agrega a la polimerasa de RNA antes de que ésta se una al DNA, la transcripción comienza en sitios específicos (fig. 11-6*a, b*). La unión del factor sigma al núcleo de la enzima incrementa la afinidad de la enzima para unirse a los sitios promotores del DNA y disminuir su afinidad por el DNA en general.

[1] Los organismos Archaea constituyen el tercer reino de los organismos vivos y también poseen una sola polimerasa de RNA, pero ésta tiene una composición de subunidades muy diferente respecto de la descrita aquí y se relaciona de manera estrecha con las polimerasas de RNA eucariotas.

Los análisis cristalográficos de rayos X de la polimerasa de RNA bacteriana (véase fig. 11-8) revelan una molécula con forma de "tenazas de cangrejo" con un par de pinzas móviles (o quijadas) localizadas en un canal interno con carga positiva. Cuando el factor sigma interactúa con el promotor, las mandíbulas de la enzima fijan el DNA dúplex corriente abajo, el cual se localiza dentro del canal (como se muestra en la figura 11-4*b*). La enzima separa entonces (o *funde*) las dos cadenas de DNA en la región que rodea al sitio de inicio (fig. 11-6*c*). La separación de las cadenas torna a la cadena molde accesible al sitio activo de la enzima, el cual se halla en la pared posterior del canal. El inicio de la transcripción parece ser un proceso difícil de activar debido a que la polimerasa de RNA lleva a cabo casi siempre diferentes intentos infructuosos para ensamblar una transcripción de RNA. Una vez que 10 a 12 nucleótidos se han incorporado de manera satisfactoria a la transcripción en crecimiento, la enzima sufre un cambio importante en su conformación y se transforma en un *complejo transcripcional de elongación* que puede moverse de modo procesivo a lo largo del DNA. En el modelo que se muestra en la figura 11-6*d*, a la formación de un complejo de elongación le sigue la liberación del factor σ.

Los promotores bacterianos se localizan en la región del DNA justo antes del sitio de inicio de la síntesis de RNA (fig. 11-7). El nucleótido en el cual comienza la transcripción se denomina +1 y el nucleótido anterior −1. Las porciones del DNA anteriores al sitio de inicio (hacia el extremo 3′ de la plantilla) se encuentran *corriente arriba* del sitio de inicio. Las porciones del DNA que son posteriores al sitio de inicio (hacia el extremo 5′ de la plantilla) se hallan *corriente abajo.* El análisis de las secuencias de DNA en los segmentos corriente arriba de un gran número de genes bacterianos revela que dos secuencias pequeñas de DNA son similares entre diferentes genes. Una de estas secuencias se localiza aproximadamente 35 bases corriente arriba del sitio de inicio y casi siempre presenta la secuencia TTGACA (fig. 11-7). Dicha secuencia (conocida como el elemento −35) se denomina la **secuencia de consenso**, que indica que es la versión más común de la secuencia conservada, si bien hay algunas variaciones entre los diferentes genes. La segunda secuencia conservada se localiza alrededor de 10 bases corriente arriba del sitio de inicio donde aparece la secuencia TATAAT (fig. 11-7). Este punto en el promotor, llamado *caja de Pribnow* por la persona que lo descubrió, se encarga de identificar el nucleótido preciso que activa la transcripción.

Las células bacterianas poseen diferentes factores sigma que reconocen distintas versiones de la secuencia promotora. La proteína sigma[70] se conoce como el factor *housekeeping* (o activador) debido a que inicia la transcripción de la mayoría de los genes. Factores sigma alternativos comienzan la transcripción de un pequeño número de genes específicos que participan en respuestas comunes. Por ejemplo, cuando las células de *E. coli* están sujetas a una repentina elevación de la temperatura, se sintetiza un nuevo factor sigma que reconoce una secuencia promotora diferente y lleva a la transcripción coordinada de una variedad de *genes de respuesta al calor*. Los productos de estos genes protegen a las proteínas de la célula del daño térmico (pág. 78).

Del mismo modo que la transcripción se inicia en puntos específicos en el cromosoma, la terminación también sucede cuando el mecanismo de transcripción llega a una secuencia nucleotídica específica. En casi la mitad de los casos se requiere una proteína semejante a un anillo llamada *rho* para la conclusión de la transcripción bacteriana. Rho rodea al RNA recién sintetizado y se mueve a lo largo de la cadena en dirección 3′ hacia la polimerasa, donde ésta separa el RNA transcrito del DNA al cual está unido. En otros casos, la polimerasa detiene la transcripción cuando alcanza la *secuencia de terminación* y se libera de la cadena de RNA completa sin la necesidad de factores adicionales.

Transcripción y procesamiento del RNA en células eucariotas

Como lo descubrió en 1969 Robert Roeder de la *University of Washington*, las células eucariotas tienen tres proteínas transcriptoras distintas en el núcleo, cada una encargada de la síntesis de un grupo distinto de RNA (cuadro 11-1). Las plantas tienen una cuarta polimerasa de RNA recién descubierta que no es esencial para la vida. No se ha encontrado ningún procariota con diferentes polimerasas de RNA, pero los eucariotas más simples (levaduras) tienen los mismos tres tipos distintos observados en las células de mamífero. Esta diferencia en el número

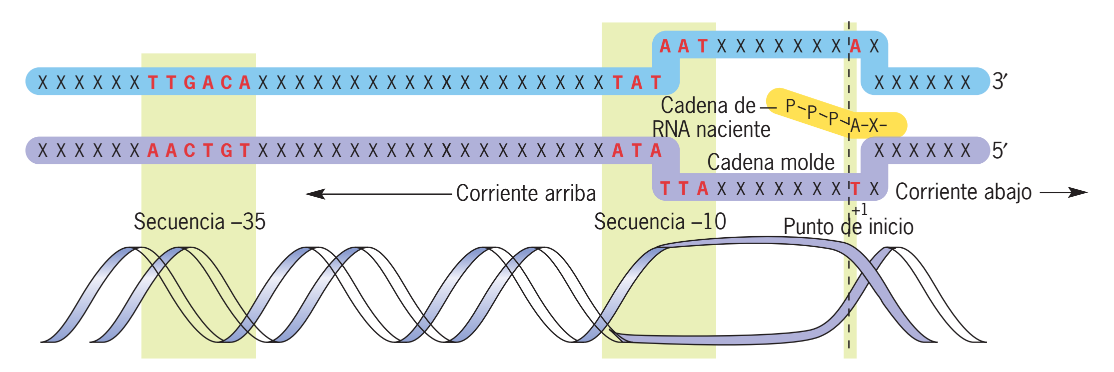


FIGURA 11-7 Elementos básicos de una región promotora en el DNA de la bacteria *E. coli*. Las secuencias clave de regulación necesarias para el inicio de la transcripción se encuentran en las regiones localizadas a −35 y −10 pares de bases del sitio en el cual comienza la transcripción. El sitio de inicio marca el límite entre los lados + y − del gen.

Cuadro 11-1 Polimerasas de RNA nucleares de eucariotas

Enzima	RNA sintetizados
Polimerasa de RNA I	rRNA mayores (de 28S, 18S, 5.8S)
Polimerasa de RNA II	mRNA, principalmente RNA nucleares pequeños (snRNA y snoRNA), microRNA y RNA de telomerasa
Polimerasa de RNA III	RNA pequeños, incluidos tRNA, rRNA de 5S y snRNA de U6
Polimerasa de RNA IV [sólo plantas (?)]	siRNA

de polimerasas de RNA es otra característica que distingue a los procariotas de las células eucariotas (véase la nota al pie en la página 435).

La comprensión de la transcripción en eucariotas avanzó de manera notoria con la notificación de la estructura de la polimerasa II de levaduras descubierta por cristalografía de rayos X y obtenida por Roger Kornberg y sus colegas de la *Stanford University*. A pesar de que la enzima de las levaduras tiene siete o más subunidades que sus contrapartes bacterianas, el núcleo estructural fundamental de las dos enzimas y su mecanismo básico de transcripción son virtualmente idénticos (fig. 11-8). Algunas de las subunidades adicionales de las polimerasas eucariotas tienen al parecer funciones clave durante la interacción de la enzima con otras proteínas. De hecho, una diferencia importante entre la transcripción en procariotas y eucariotas es el requerimiento en los segundos de una gran variedad de proteínas accesorias, o **factores transcripcionales**. Estas proteínas participan casi sin excepción en cada aspecto del proceso de la transcripción y contribuyen a la unión de la polimerasa al DNA molde, inicio de la transcripción, elongación y terminación. A pesar de que los factores de transcripción son cruciales para la operación de los tres tipos de polimerasas de RNA eucariotas, sólo se alude a la síntesis del RNA mensajero por la polimerasa de RNA II (pág. 445).

Los tres tipos principales de RNA (mRNA, rRNA y tRNA) derivan de moléculas precursoras de RNA que son mucho más grandes que el producto final de RNA. Este precursor inicial de RNA es equivalente en longitud a la longitud completa del DNA que se transcribe y se llama **transcripción primaria**, o **pre-RNA**. El segmento correspondiente del DNA del cual procede una transcripción primaria se conoce como **unidad de transcripción**. Las transcripciones primarias no existen dentro de la célula como un RNA desnudo y por lo general se vinculan con proteínas apenas después de sintetizarse. Por lo regular, estas transcripciones tienen una existencia efímera y se *procesan* en pequeños RNA funcionales por medio de reacciones de "corte y empalme". El procesamiento de RNA requiere gran variedad de pequeños RNA (de 90 a 300 nucleótidos de longitud) y sus proteínas relacionadas. En las siguientes secciones se examinan las actividades vinculadas con la transcripción y el procesamiento de cada uno de los tipos principales de RNA eucariota.

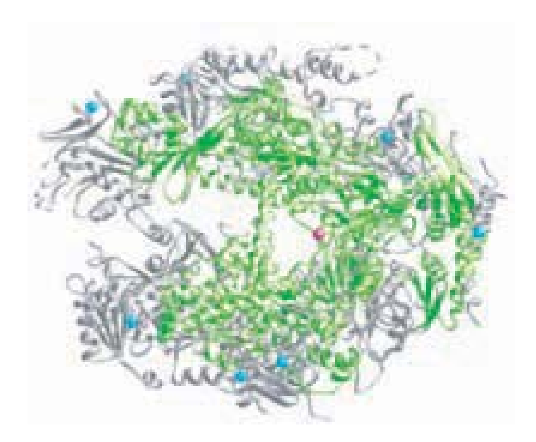


FIGURA 11-8 **Estructura del núcleo de la polimerasa de RNA determinada por cristalografía de rayos X.** Diagrama de las dos subunidades grandes de la polimerasa de RNA II eucariota que muestra el núcleo de la enzima. Las regiones de la polimerasa bacteriana que son homólogas desde el punto de vista estructural aparecen en verde. Se muestra el canal grande que rodea a la cadena corriente abajo del DNA. El metal bivalente situado en el extremo del canal y dentro del sitio activo se ve como una esfera en rojo. (Tomada de Patrick Cramer, David A. Bushnell y Roger D. Kornberg, Science 292:1874, 2001; © 2001 American Association for the Advancement of Science.)

REVISIÓN ?

1. ¿Cuál es la función de un promotor en la expresión de un gen?, ¿dónde se localizan los promotores para las polimerasas procariotas?
2. Describa los pasos durante el inicio de la transcripción en procariotas. ¿Cuál es la función del factor sigma?, ¿cuál es la naturaleza de la reacción en la cual los nucleótidos se incorporan en la cadena del RNA en crecimiento?, ¿cómo se determina la especificidad de la incorporación de nucleótidos?, y ¿cuál es el papel de la hidrólisis de pirofosfato?
3. ¿Qué distingue a las polimerasas de RNA de procariotas y eucariotas?, ¿cuál es la relación entre el pre-RNA y el RNA maduro?

11.3 SÍNTESIS Y PROCESAMIENTO DE LOS RNA RIBOSOMAL Y DE TRANSFERENCIA

Las células eucariotas contienen millones de ribosomas, cada uno con diferentes moléculas de rRNA y docenas de proteínas ribosomales. La composición del ribosoma de mamífero se muestra en la figura 11-9. Los ribosomas son tan numerosos que más de 80% del RNA de la mayoría de las células consiste en RNA ribosomal. Para garantizar que las células sean capaces de tener esa gran cantidad de transcripciones, las secuencias de DNA que codifican el rRNA se repiten cientos de veces. Este DNA, conocido como **rDNA**, se localiza casi siempre en una o algunas regiones del genoma. El genoma humano posee cinco regiones rDNA, cada una en distintos cromosomas. En

Ribosoma eucariota (de mamífero)

49 proteínas ribosomales

33 proteínas ribosomales

rRNA 5S

rRNA 5.8S

rRNA 18S

rRNA 28S

Subunidad 60S

Subunidad 40S

Ribosoma 80S de 24 nm

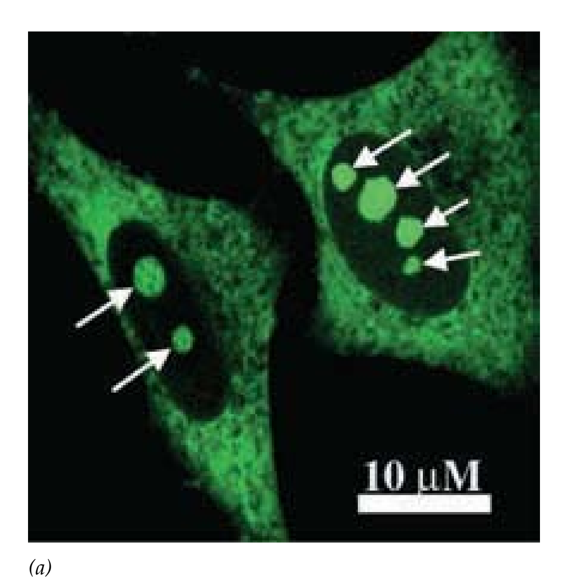
FIGURA 11-9 Composición macromolecular de un ribosoma de mamífero. El esquema muestra los componentes que están presentes en cada una de las subunidades de un ribosoma de mamífero. La síntesis y procesamiento de los rRNA y el ensamble de las subunidades ribosomales se discuten en las páginas siguientes. (TOMADA DE D. P. SNUSTAD ET AL., PRINCIPLES OF GENETICS. © 1997, JOHN WILEY & SONS, INC. REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE JOHN WILEY & SONS, INC.)

una célula sin división (interfase), los grupos de rDNA están reunidos como parte de una o más formas irregulares de estructuras nucleares, conocidas como **nucleolos**, que participan en la generación de ribosomas (fig. 11-10*a*).

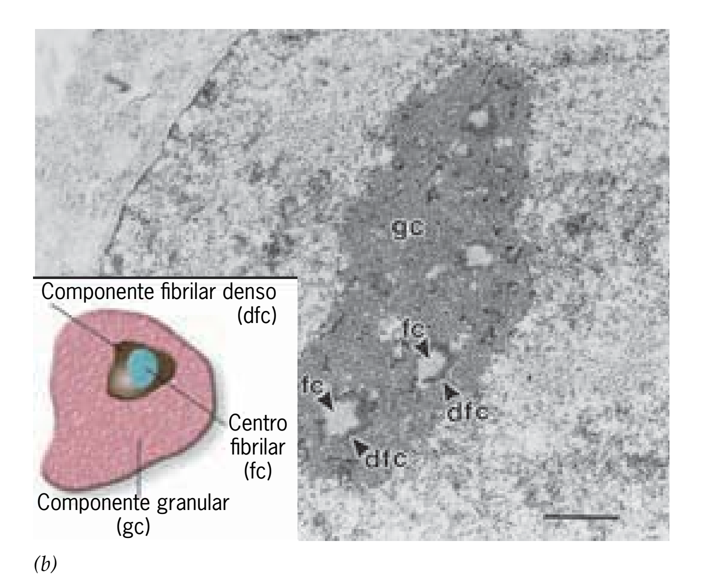
La mayor parte de un nucleolo se compone de subunidades ribosomales que le confieren apariencia granular (fig. 11-10*b*). Localizados dentro de esta masa granular se encuentran una o más porciones nucleares redondeadas que consisten de manera primaria en material fibrilar. Como se describe en la figura 11-10, el material fibrilar contiene al parecer moldes de rDNA y transcripciones incipientes de rRNA. En las siguientes secciones se describe el proceso por medio del cual se sintetizan estas transcripciones de rRNA.

Síntesis del precursor de rRNA

Por lo general, los oocitos son células muy grandes (p. ej., 100 µm de diámetro en mamíferos) y los de anfibios suelen ser gigantes (superiores a 2.5 mm en diámetro). Durante el crecimiento de los oocitos de anfibio la cantidad de rDNA en la célula se incrementa de manera considerable y también el número de nucleolos (fig. 11-11*a*). Se requiere la amplificación selectiva de rDNA para generar un gran número de ribosomas que se necesitan para que el huevo fecundado comience su desarrollo embrionario.

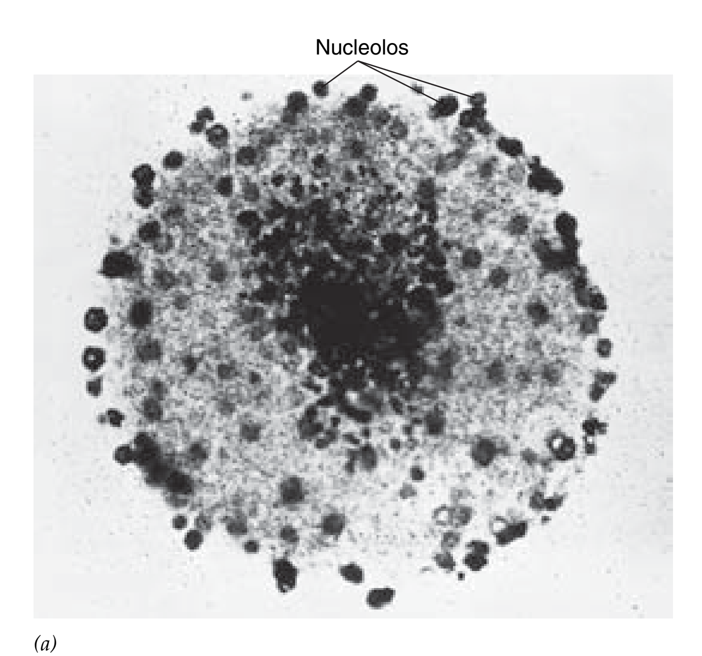


(*a*)

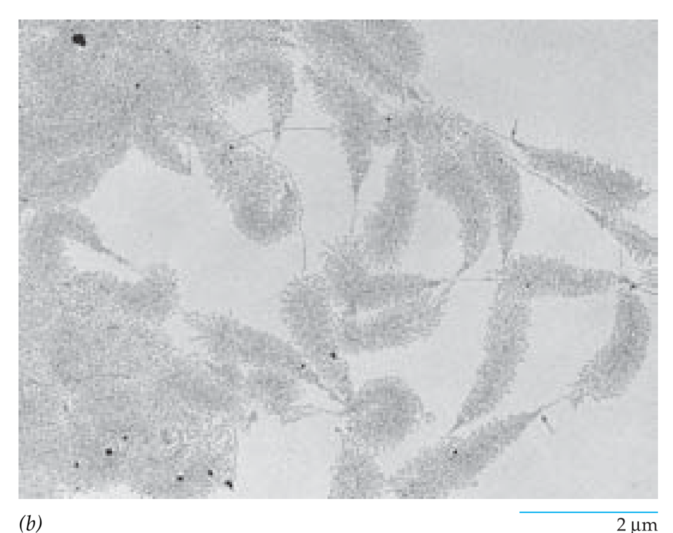


(*b*)

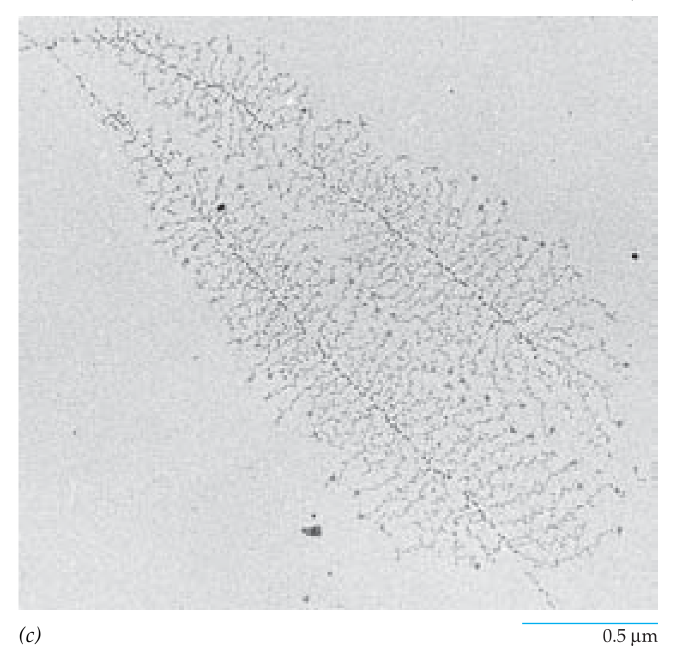
FIGURA 11-10 El nucleolo. *a*) Micrografía óptica de dos células humanas de HeLa transfectadas con un gen que codifica a una proteína ribosomal fusionada a la proteína fluorescente verde (GFP). La proteína ribosomal fluorescente puede observarse en el citoplasma, donde se sintetiza y realiza su función, y en el nucleolo (flechas blancas), donde se ensambla para formar los ribosomas. *b*) Micrografía electrónica de una sección que muestra parte de un núcleo con el nucleolo. Se pueden distinguir tres regiones morfológicamente distintas. La parte principal del nucleolo consiste en un componente granular (gc). Embebidos dentro de los gránulos se hallan los centros fibrilares (fc) que están rodeados por componentes fibrilares más densos (dfc). El recuadro muestra un dibujo esquemático de estas partes del nucleolo. De acuerdo con un modelo, el fc contiene el DNA que codifica al RNA ribosomal y el dfc contiene la transcripción del pre-rRNA emergente y proteínas relacionadas. Según este modelo, la transcripción del precursor del pre-rRNA se realiza en la frontera entre el fc y el dfc. (Nota: los nucleolos tienen otras funciones no relacionadas con la biogénesis de los ribosomas que no se consideran en este texto.) La barra tiene un diámetro de 1 µm. (*A*, TOMADA DE C. E. LYON Y A. I. LAMOND, CURR BIOL 10:R323, 2000; *B*, TOMADA DE PAVEL HOZAK ET AL., J CELL SCIENCE 107:641, 1994; CON AUTORIZACIÓN DE THE COMPANY OF BIOLOGISTS, LTD.)



(a)



(b)



(c)

FIGURA 11-11 La síntesis del RNA ribosomal. *a*) Micrografía óptica de un núcleo aislado de un oocito de *Xenopus* teñido que revela cientos de nucleolos. *b*) Micrografía electrónica de un segmento de DNA aislado de un nucleolo del oocito del *Xenopus*. El DNA (llamado rDNA) contiene los genes que codifican a los dos RNA ribosomales grandes, los cuales se forman a partir de una sola transcripción primaria. Numerosos genes se muestran aquí, cada uno en el proceso de la transcripción. Ésta se reconoce por la estructura fibrilar unida al DNA. Dichas fibras consisten en RNA naciente y proteínas relacionadas. Los segmentos de DNA entre los genes que se someten a transcripción son espaciadores que no se transcriben. Las flechas indican sitios donde se inicia la transcripción. *c*) Vista cercana de dos genes nucleolares sujetos a transcripción. La longitud de la transcripción primaria del rRNA emergente se incrementa conforme la distancia aumenta desde el punto de inicio. Las moléculas de la polimerasa de RNA de la base de cada fibrilla pueden observarse como puntos. (*A*, TOMADA DE DONALD D. BROWN E IGOR B. DAWID, SCIENCE 160:272, 1968; © 1968 AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE. *B-C*, CORTESÍA DE OSCAR L. MILLER, JR., Y BARBARA R. BEATTY.)

Debido a que estos oocitos contienen cientos de nucleolos, cada uno de los cuales elabora rRNA de modo activo, estos oocitos son modelos ideales para el estudio de la síntesis de rRNA y su procesamiento.

La comprensión de la síntesis del rRNA avanzó de forma notable a finales de la década de 1960 con el desarrollo de técnicas diseñadas por Oscar Miller, Jr., de la *University of Virginia* para visualizar "genes activos" por medio de microscopia electrónica. Para llevar a cabo estos estudios, los núcleos o porciones fibrilares del nucleolo de los oocitos se prepararon de manera cuidadosa para revelar la presencia de grandes fibras circulares. Cuando una de estas fibras se examinó por medio de microscopia electrónica, se observó algo semejante a una estructura de árbol de Navidad (fig. 11-11*b*, *c*). Las micrografías electrónicas de la figura 11-11 revelan diferentes aspectos de la actividad nucleolar y la síntesis de rRNA.

1. La micrografía en la figura 11-11*b* muestra numerosos genes que codifican el RNA ribosomal situados uno después del otro a lo largo de una sola molécula de DNA, lo cual revela el ordenamiento en tándem de los genes de rRNA repetidos.
2. La micrografía en la figura 11-11*b* revela una imagen estática de sucesos dinámicos que ocurren en el nucleolo. La fotografía provee con gran detalle la información acerca de los procesos de la transcripción del rRNA. Cada una de las 100 o más fibras que emergen del DNA, como las ramas de un árbol de Navidad, es una transcripción naciente de rRNA que aparece en el proceso de la elongación. Los gránulos oscuros en la base de cada fibrilla, que son visibles en la fotografía magnificada de la figura 11-11*c*, son las moléculas de polimerasa de RNA I al sintetizar esta transcripción. La longitud de las fibrillas se incrementa de forma gradual desde uno de los extremos del tronco del árbol de Navidad al otro extremo. Las fibrillas cortas son moléculas de RNA de pocos nucleótidos que se unen por moléculas de polimerasa al DNA muy cercano al sitio de inicio de la transcripción. Las fibrillas más largas están más cerca de la terminación de

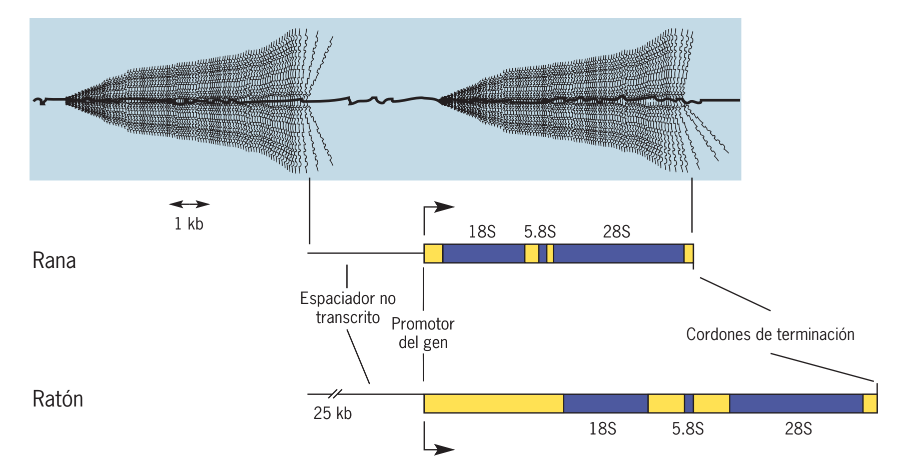


FIGURA 11-12 La unidad de transcripción del rRNA. El dibujo de la parte superior muestra la apariencia de una porción del DNA de un nucleolo, el cual transcribe un rRNA. La representación inferior ilustra una de las unidades de transcripción que codifica al rRNA en *Xenopus* y ratones. Estas partes del DNA que codifican a los productos de rRNA maduros aparecen en azul. Las regiones del espacio transcrito, esto es, áreas del DNA que se transcriben pero cuyos RNA correspondientes se degradan durante el procesamiento, se muestran en amarillo. El espaciador no transcrito, que permanece entre las unidades de transcripción, contiene las regiones promotoras en el extremo 5′ del gen. (Según B. Sollner-Webb y E. B. Mougey, Trends Biochem. Sci. 16:59, 1991.)

la transcripción. La longitud del DNA entre las fibrillas más cortas y las más largas de RNA corresponde a una sola unidad de transcripción. El promotor permanece corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. La elevada densidad de las moléculas de polimerasa de RNA a lo largo de cada unidad de transcripción (cerca de uno por cada 100 pares de bases de DNA) refleja la gran velocidad de la síntesis de rRNA en los nucleolos de estos oocitos.

3. Puede observarse en la figura 11-11*c* que las fibrillas de RNA contienen nudos y partículas relacionados. Estas partículas consisten en RNA y proteínas que trabajan juntas para convertir a los precursores de rRNA en sus productos finales de rRNA y ayudar a ensamblar a éstos en las subunidades ribosomales.
4. Como puede observarse en la figura 11-11*b*, la región de la fibra del DNA entre las unidades de transcripción adyacentes es el lugar donde se forman las cadenas de RNA. Debido a que esta región del grupo de genes ribosomales no se transcribe, se conoce como el **espaciador no transcrito** (fig. 11-12). Los espaciadores no transcritos están presentes entre varios tipos de genes repetidos en tándem, incluidos los que contienen los tRNA y las histonas.

Procesamiento del rRNA precursor

Los ribosomas eucariotas poseen cuatro distintos RNA ribosomales, tres localizados en la subunidad grande y uno en la pequeña. En los seres humanos, la subunidad grande contiene moléculas de RNA 28S, 5.8S y 5S y una molécula de RNA 18S la subunidad pequeña.[2] Varias nucleasas cortan tres de estos rRNA (los 28S, 18S y 5.8S) en una transcripción única primaria (llamado **pre-rRNA**). Los 5S rRNA se sintetizan a partir de un RNA precursor por separado fuera del nucleolo. Primero se analiza el pre-rRNA.

Dos de las características del pre-rRNA, cuando se comparan con otras transcripciones de RNA, son el gran número de nucleótidos metilados y los residuos de seudouridina. En el momento en que un precursor de pre-rRNA humano se somete a corte, más de 100 grupos metilo se agregan a los grupos de ribosa en la molécula y alrededor de 95 de sus residuos de uridina se convierten por modificación química en seudouridina (véase fig. 11-15*a*). La totalidad de estas modificaciones ocurre después de que los nucleótidos se incorporan en el RNA naciente, esto es, *de manera postranscripcional*. Los nucleótidos modificados se localizan en posiciones específicas, se agrupan en porciones definidas de la molécula y se conservan en todos los organismos. Todos los nucleótidos en el pre-rRNA modificados permanecen como parte de los productos finales, mientras que las secciones no modificadas se descartan durante el proceso. La función de los grupos metilo y seudouridinas no es clara. Estos nucleótidos modificados pueden proteger partes del pre-rRNA del corte enzimático, promover el plegamiento del rRNA en su estructura tridimensional final o promover interacciones de los rRNA con otras moléculas. Las mutaciones en la enzima que realiza la conversión de uridina a seudouridina en los rRNA (y algunos otros RNA) se han relacionado con una enfermedad fatal muy rara, conocida como disqueratosis, identificable por anormalidades dérmicas, alteraciones de la médula ósea y una mayor susceptibilidad al cáncer.

Debido a que los rRNA se metilan en considerable proporción, su síntesis puede analizarse tras incubar las células con metionina marcada con radiactividad, un compuesto que sirve en la mayoría de las células como donante de grupos metilo.

[2] El valor S (o unidad de Svedberg) se refiere al coeficiente de sedimentación del RNA; cuanto más grande sea el número, con mayor rapidez se mueven las moléculas a través de un campo de fuerza durante la centrifugación y (para un grupo de moléculas químicamente semejantes) mayor el tamaño de las moléculas. Los RNA 28S, 18S, 5.8S y 5S consisten de nucleótidos con longitudes de unos 5 000, 2 000, 160 y 120 nucleótidos, respectivamente.

El grupo metilo se transfiere por medios enzimáticos de la metionina a nucleótidos en los pre-rRNA. Cuando se añade la metionina [^{14}C] a células de mamífero cultivadas por un corto periodo, una fracción considerable de la radiactividad incorporada se halla en una molécula de RNA 45S, con una longitud de unos 13 000 nucleótidos. Los RNA 45S se cortan en moléculas pequeñas que entonces se convierten en las moléculas rRNA 28S, 18S y 5.8S. La longitud combinada de las tres moléculas de rRNA maduros se aproxima a 7 000 nucleótidos o un poco más de la mitad de la transcripción primaria.

Algunos de los pasos que sigue la vía del procesamiento de los pre-rRNA 45S para convertirse en los rRNA maduros pueden analizarse si se incuban las células de mamífero en un periodo muy breve con metionina marcada y se traspasan las células a un medio no marcado en diferentes lapsos (fig. 11-13). (Este tipo de experimentos de "pulso-persecución" se discutió en la página 277.) Como se indicó, las primeras especies que se marcaron en este tipo de experimento fueron las transcripciones primarias 45S, las cuales se ven como unos picos de radiactividad (línea punteada roja) en la fracción nucleolar RNA después de 10 min. Luego de una hora, el RNA 45S ha desaparecido del nucleolo y lo remplaza el RNA 32S, el cual es uno de los dos productos principales generados a partir de la transcripción primaria 45S. El RNA 32S se ve como un pico distinto de la fracción nucleolar desde los 40 a los 150 min. El RNA 32S es un precursor de los rRNA maduros 28S y 5.8S. El otro producto principal del pre-rRNA 45S abandona el núcleo muy rápido y aparece en el citoplasma como el rRNA maduro 18S (se observa a los 40 min en la fracción citoplásmica). Después de un periodo de dos o más horas, casi toda la radiactividad ha abandonado el nucleolo y la mayor parte se ha acumulado en el citoplasma en la forma de subunidades 28S y 18S de rRNA. La radiactividad en

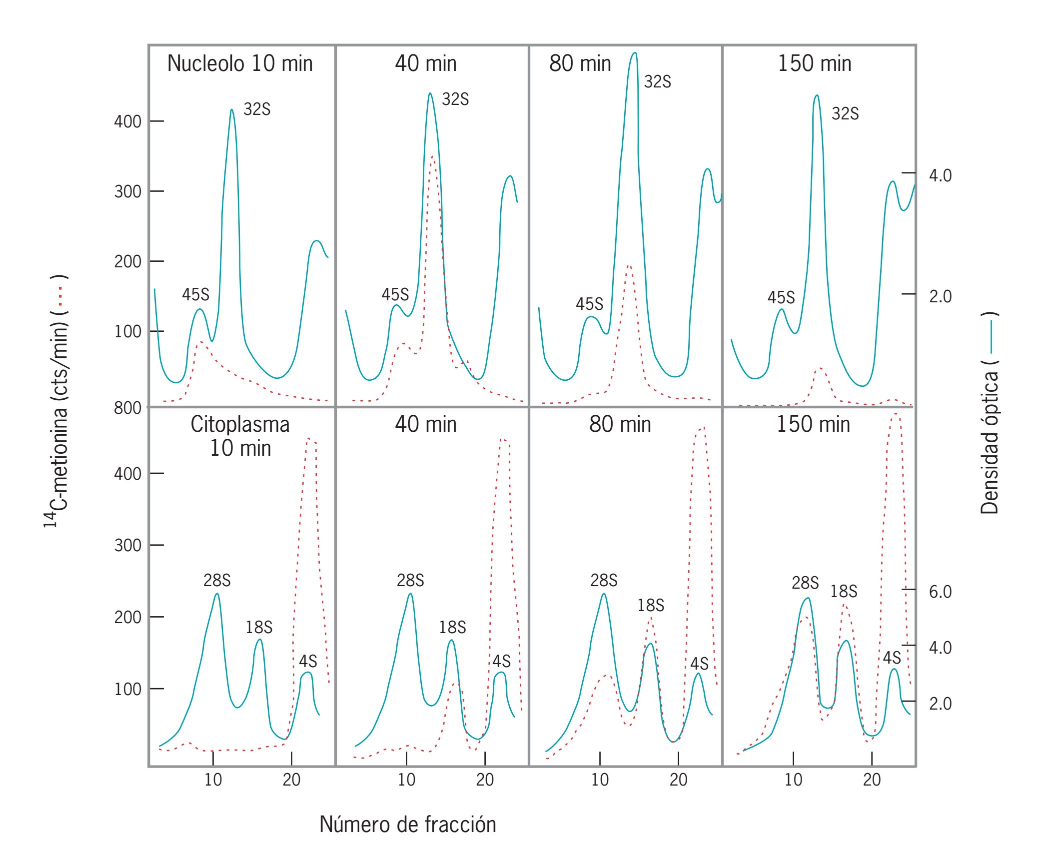


FIGURA 11-13 Análisis cinético de la síntesis y procesamiento del rRNA. Un cultivo de células de mamífero se incubó durante 10 min en [^{14}C] metionina y luego se cambió a un medio no marcado en diferentes tiempos, como se indica en cada panel. Después del cambio, las células se lavaron para dejarlas libres del isótopo, se homogeneizaron y se prepararon fracciones citoplásmicas y nucleolares. El RNA de cada fracción se extrajo y se analizó por medio de sedimentación en gradiente de densidad de sacarosa. Como se discute en la sección 18.10, esta técnica separa a los RNA de acuerdo con su tamaño (los grandes son los más próximos a la parte inferior del tubo, el cual corresponde a la fracción 1). La línea continua representa la absorbancia ultravioleta de cada fracción celular, la cual provee una medida de la cantidad de RNA de cada clase de acuerdo con su tamaño. Este perfil de absorbancia no cambia con el tiempo. La línea punteada se refiere a la radiactividad en diferentes momentos durante el cambio. Las gráficas del RNA nucleolar (perfiles superiores) muestran la síntesis de los precursores de rRNA 45S y su conversión subsecuente a la molécula 32S, que es un precursor de los rRNA 28S y 5.8S. Los otros productos principales del precursor 45S dejan el núcleo con rapidez y de esta forma no aparecen de manera importante en el RNA nucleolar. Los perfiles inferiores señalan el tiempo de la aparición de las moléculas de rRNA maduro en el citoplasma. Los rRNA 18S aparecen en el citoplasma antes de la aparición de las especies más grandes 28S, que se correlacionan con el rápido éxodo de aquéllos desde el nucleolo. (TOMADA DE H. GREENBERG Y S. PENMAN, J MOL BIOL 21:531, 1966; © 1966, CON AUTORIZACIÓN DE THE PUBLISHER ACADEMIC PRESS.)

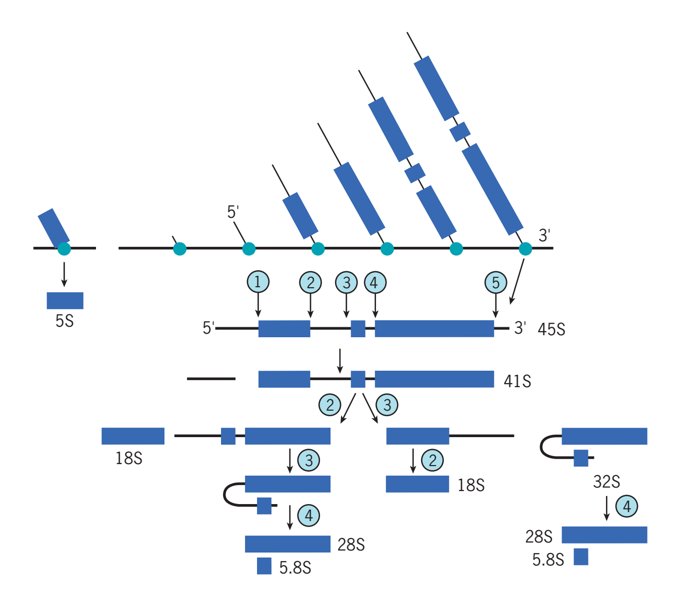


FIGURA 11-14 Un esquema propuesto para el procesamiento del RNA ribosomal de mamíferos. La transcripción primaria para el rRNA es una molécula 45S de unas 13 000 bases. Los cortes principales durante el procesamiento de este pre-rRNA se indican por medio de los números encerrados en círculo. El corte de la transcripción primaria en los sitios 1 y 5 elimina las secuencias transcritas externas 5′ y 3′ y produce un intermediario 41S. El segundo corte puede ocurrir en los sitios 2 o 3 según el tipo de célula. El corte en el sitio 3 genera el intermediario 32S visto en las curvas de la figura anterior. Durante los pasos finales del procesamiento, las secciones 28S y 5.8S se separan y los extremos de diferentes intermediarios se procesan a su tamaño maduro final. (Tomada de R. P. Perry, J Cell Biol 91:29S, 1981; con autorización de la Rockefeller University Press.)

el pico del RNA 4S incluye al rRNA 5.8S y los grupos metilo transferidos a las moléculas pequeñas de tRNA. La figura 11-14 muestra la vía común del procesamiento de una transcripción primaria de un rRNA.

El papel de los snoRNA El procesamiento de los pre-rRNA se completa con la ayuda de un gran número de **RNA nucleolares pequeños** (o **snoRNA**) que se agregan con proteínas particulares para formar partículas llamadas **snoRNP** (**ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas**). Las micrografías electrónicas indican que los snoRNP comienzan a relacionarse con los precursores del rRNA antes de que éste se transcriba por completo. La primera partícula de RNP que se une a una transcripción de pre-rRNA contiene el snoRNA U3 y más de dos docenas de proteínas diferentes. Este componente importante de la maquinaria del procesamiento de rRNA puede verse como un balón que se une con el extremo saliente de cada cadena de RNA emitida en la figura 11-11*c*, donde se cataliza la remoción del extremo 5′ terminal de la transcripción (fig. 11-14). Se cree que algunos de los cortes enzimáticos indicados en la figura 11-14 los cataliza el "exosoma", que es una máquina que degrada el RNA y que posee alrededor de una docena de exonucleasas diferentes.

Hace algunos años se identificaron el U3 y otros snoRNA debido a que están presentes en grandes cantidades (cerca de 10^6 copias por célula). Por el contrario, se descubrió una clase diferente de snoRNA presente en baja concentración (unas 10^4 copias por célula). Se trata de snoRNA de menor abundancia que pueden dividirse en dos grupos con base en su función y similitudes en su secuencia nucleotídica. Los miembros de un grupo (llamado *snoRNA de caja C/D*) determinan qué nucleótidos en el pre-rRNA se metilan en sus residuos de ribosa y los miembros del otro grupo (denominado *snoRNA de caja H/ACA*) establecen las uridinas que se convierten en seudouridinas. Las estructuras de los nucleótidos modificados de estas dos reacciones se muestran en la figura 11-15*a*.

Los dos grupos de snoRNA contienen segmentos relativamente largos (de 10 a 21 nucleótidos) que complementan a secciones de las transcripciones de rRNA. Estos snoRNA son un excelente ejemplo de cómo los ácidos nucleicos de cadena sencilla tienen secuencias nucleótidas complementarias capaces de formar híbridos de doble cadena. En este caso, cada snoRNA se une a una porción específica del pre-rRNA para formar un dúplex RNA-RNA. El snoRNA unido guía entonces a la enzima (sea una metilasa o una seudouridilasa) dentro del snoRNP para modificar un nucleótido en particular en el pre-rRNA. En conjunto suman alrededor de 200 diferentes snoRNA, uno para cada sitio en el pre-rRNA metilado en la ribosa o seudouridilato. Si se elimina el gen que codifica a uno de estos snoRNA, uno de los nucleótidos del pre-rRNA no puede modificarse de manera enzimática. El mecanismo de acción de estos dos tipos de snoRNA se detalla en la figura 11-15*b*, *c*. El aspecto relevante de estos RNA es que se codifican dentro de las secuencias internas de otros genes (pág. 458).

El nucleolo es el sitio no sólo del procesamiento del rRNA, sino también del ensamble de dos subunidades ribosomales. Dos tipos de proteínas se vinculan con el RNA cuando éste se procesa: proteínas ribosomales que permanecen en las subunidades y proteínas accesorias que tienen una interacción transitoria con los intermediarios del rRNA y se requieren sólo para el procesamiento. En este último grupo se incluyen más de una docena de helicasas de RNA, que son enzimas que desenrollan las regiones de doble cadena del RNA. Al parecer, dichas enzimas intervienen en muchos reordenamientos estructurales que ocurren durante la formación del ribosoma, incluidas la vinculación y disociación de los snoRNA.

Síntesis y procesamiento del rRNA 5S

Un rRNA 5S, de unos 120 nucleótidos de largo, es parte de la subunidad ribosomal grande, sea de procariotas o eucariotas. Un gran número de genes idénticos, separados de los otros genes de rRNA y localizados fuera del nucleolo, codifica en los eucariotas a las moléculas de rRNA 5S. Después de la síntesis, el rRNA 5S se transporta al nucleolo para unirse con otros componentes que participan en el ensamble de las subunidades ribosomales.

Los genes para rRNA 5S son transcritos por polimerasa de RNA III. La polimerasa de RNA III difiere de las otras polimerasas en que puede unirse a un sitio promotor situado dentro de la porción transcrita del gen blanco.[3] La posición interna del

[3] La polimerasa de RNA III transcribe varios RNA diferentes y se une a un promotor interno cuando transcribe un pre-RNA 5S o pre-tRNA, pero se une a un promotor corriente arriba si transcribe los precursores de otros RNA, incluido el snRNA U6.

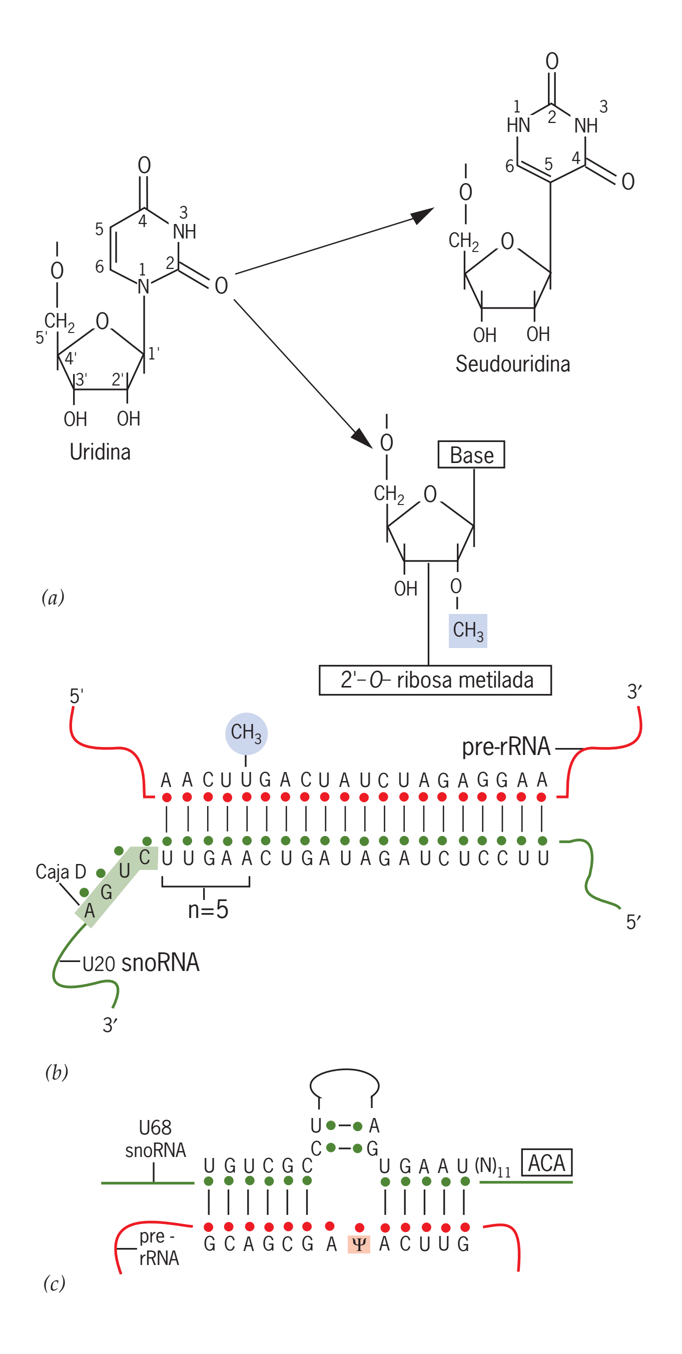


FIGURA 11-15 Modificación del pre-rRNA. *a*) Las modificaciones más frecuentes de los nucleótidos en un pre-rRNA son la conversión de una uridina a una seudouridina y la metilación de una ribosa en el sitio 2′ del azúcar. Para convertir uridina a seudouridina se rompe el enlace N1-C1′ y el anillo de uracilo se rota 180º, el cual coloca al C5 del anillo en posición para formar un nuevo enlace con C1′ de la ribosa. Se piensa que componentes de una proteína del snoRNP catalizan estas modificaciones químicas, pero las enzimas aún no se identifican. *b*) Formación de un dúplex RNA-RNA entre snoRNA U20 y una porción del pre-rRNA que genera la metilación de 2′ ribosa. En cada caso, el nucleótido metilado en el rRNA se une mediante un puente de hidrógeno a un nucleótido del snoRNA localizado a cinco pares de bases de la caja D. Esta última, que contiene la secuencia invariable CUGA, está presente en todos los snoRNA que guían la metilación de la ribosa. *c*) Formación de un dúplex RNA-RNA entre snoRNA U68 y una porción del pre-rRNA que lleva a la conversión de una uridina en seudouridina (ψ). La seudouridilación tiene lugar en un sitio relativamente fijo para un plegamiento en forma de asa en el snoRNA. Los snoRNA que controlan la seudouridilación poseen una secuencia ACA 3′ compartida. (*B*, SEGÚN J. P. BACHELLERIE Y J. CAVAILLÉ, TRENDS IN BIOCH SCI 22:258, 1997; © 1997, CON AUTORIZACIÓN DE ELSEVIER SCIENCE; *C*, SEGÚN P. GANOT ET AL., CELL 89:802, 1997.)

promotor se demostró con claridad en experimentos en los que se utilizaron genes modificados rRNA 5S transferidos a células hospedadoras y se determinó la capacidad de este DNA para servir como plantilla para la polimerasa III hospedadora. De esa forma se encontró que la región flanqueadora 5′ podía removerse en su totalidad sin que la polimerasa dejara de transcribir el DNA en el sitio normal de inicio. Sin embargo, si la deleción incluía la parte central del gen, la polimerasa no transcribía el DNA ni se unía a éste. Si el promotor interno del gen rRNA 5S se inserta en otra región del genoma, el nuevo sitio se transforma en la plantilla para la transcripción por medio de la polimerasa de RNA III.

RNA de transferencia

Se calcula que las células de plantas y animales tienen cerca de 50 especies diferentes de RNA de transferencia, cada uno codificado por una secuencia repetida de DNA. El grado de repetición varía de acuerdo con el organismo: las células de levadura tienen un *total* de 275 genes que codifican tRNA, las moscas de la fruta unos 850 y los seres humanos un estimado de 1 300. Los RNA de transferencia se sintetizan a partir de genes que se encuentran en pequeñas regiones diseminadas en el genoma. De manera característica, una sola región contiene múltiples copias de *diferentes* genes de tRNA y, por el contrario, la secuencia de DNA que codifica un tRNA específico se halla por lo general en más de una región. Los DNA incluidos en esta región (*tDNA*) tienen sobre todo secuencias espaciadoras no transcritas y las secuencias codificantes para tRNA se sitúan en intervalos irregulares en un ordenamiento repetido en tándem (fig. 11-16).

Al igual que los rRNA 5S, los tRNA se transcriben por medio de la polimerasa de RNA III y la secuencia promotora se localiza dentro de la región codificante del gen más, que en la región 5′ flanqueadora. La transcripción primaria de una molécula de tRNA es mucho más grande que la transcripción final, por lo cual los segmentos de los extremos 5′ terminal y 3′ del

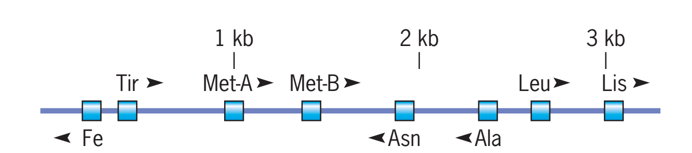


FIGURA 11-16 El ordenamiento de genes que codifican a los RNA de transferencia en *Xenopus*. El fragmento de DNA de 3.18 kilobases muestra el ordenamiento de diferentes genes de tRNA y sus espaciadores. (TOMADA DE S. G. CLARKSON ET AL., EN D. D. BROWN, ED., DEVELOPMENTAL BIOLOGY USING PURIFIED GENES, ACADEMIC PRESS, 1981.)

precursor de tRNA (y en algunos casos una pequeña parte del interior) deben eliminarse. Una de las enzimas que interviene en el procesamiento del pre-tRNA es una endonucleasa conocida como ribonucleasa P, presente en bacterias y células eucariotas, e integrada con RNA y subunidades proteicas. Es la subunidad de RNA de la ribonucleasa P que cataliza el corte del sustrato pre-tRNA y que se discute en la sección Vías experimentales de este capítulo.

REVISIÓN ?

1. Describa las diferencias entre una transcripción primaria, una unidad de transcripción, un espaciador de la transcripción y un rRNA maduro.
2. Represente una micrografía electrónica de rDNA durante la transcripción. Marque la región no transcrita espaciadora, la región transcrita espaciadora, las moléculas de la polimerasa de RNA, el snRNP U3 y el promotor.
3. Compare la organización de los genes que codifican rRNA de gran tamaño, RNA 5S y tRNA dentro del genoma de los vertebrados.

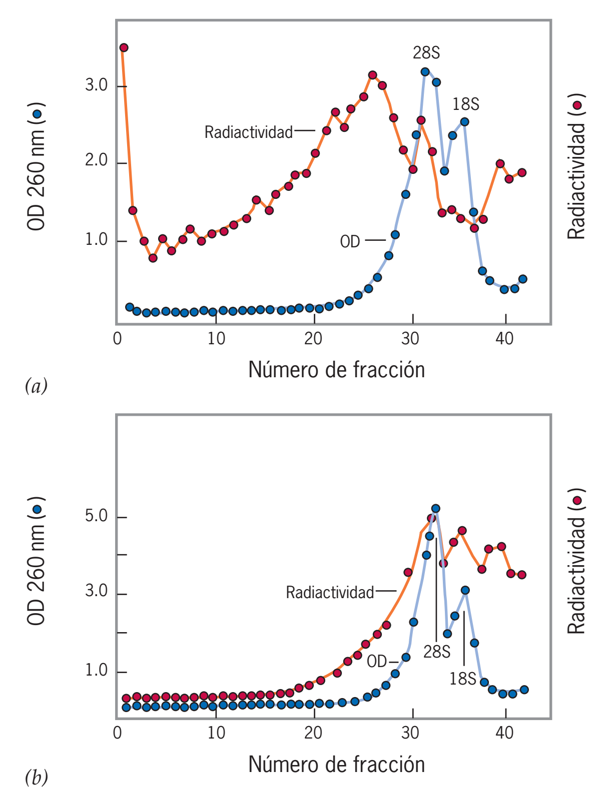


FIGURA 11-17 Formación del RNA nuclear heterogéneo (hnRNA) y su conversión a mRNA más pequeños. *a)* Las curvas muestran el patrón de sedimentación del RNA total extraído de células sanguíneas de pato después de la exposición a [^{32}P]fosfato por 30 min. Los RNA más grandes viajan mucho más durante la centrifugación y más cerca de la región inferior del tubo donde yacen. La absorbancia (línea azul) indica la cantidad total de RNA en diferentes regiones del tubo de centrifugación, mientras que las líneas rojas señalan la radiactividad correspondiente. Es evidente que la mayoría de los RNA sintetizados de novo es muy grande, más que los rRNA estables 18S y 28S. Estos RNA grandes son los hnRNA. *b)* La absorbancia y los perfiles de radiactividad del RNA se extrajeron de células marcadas por pulsos durante 30 min como en la parte *a*, pero después se continuaron por tres horas en presencia de actinomicina D, que previene la síntesis del RNA adicional. Es evidente que los hnRNA grandes se han procesado en productos de RNA más pequeños. (Tomada de G. Attardi et al., J Mol Biol 20:160, 1966. © 1966, con autorización del editor Academic Press.)

11.4 SÍNTESIS Y PROCESAMIENTO DE RNA MENSAJEROS

Cuando las células eucariotas se incuban por un corto periodo (30 min) en [^{3}H]uridina o [^{32}P]fosfato y de inmediato se cosechan, la mayor parte de la radiactividad se incorpora en un gran grupo de moléculas de RNA que tienen las siguientes propiedades: a) muestran pesos moleculares altos (hasta 80S o 50 000 nucleótidos); b) se representan como grupo por RNA diversos (heterogéneos) con distinta secuencia nucleotídica, y c) se encuentran sólo en el núcleo. Debido a estas propiedades, estos RNA se conocen como **RNA nucleares heterogéneos (hnRNA)** y se indican con la línea roja que representa la radiactividad en la figura 11-17*a*. Cuando las células incubadas con [^{3}H]uridina o [^{32}P]fosfato mediante un pulso breve se colocan en un medio sin marca radiactiva, y se vigilan por varias horas antes de cosecharlas y extraer el RNA, la cantidad de radiactividad en los RNA nucleares grandes decrece de modo notorio y aparece en su lugar un RNA mucho más pequeño en el citoplasma (línea roja en la figura 11-17*b*). Estos experimentos pioneros, iniciados por James Darnell, Jr., Klaus Scherrer y colaboradores, sugirieron que los hnRNA grandes y marcados con rapidez eran principalmente precursores de los mRNA citoplásmicos más pequeños. Un gran cuerpo de investigación ha apoyado de manera inequívoca esta interpretación en los últimos 40 años.

Es importante notar que las líneas rojas y azules de la figura 11-17 siguen un curso muy diferente. Las líneas azules, que indican la densidad óptica (p. ej., la absorbancia de la luz ultravioleta) de cada fracción, suministran información acerca de la cantidad de RNA en cada fracción después de la centrifugación. A partir de los trazos de las líneas azules es evidente que la mayor parte del RNA en la célula está presente como 18S y rRNA 28S (junto con varios RNA pequeños que permanecen cerca de la parte superior del tubo). Las líneas rojas, que señalan la radiactividad en cada fracción, aportan datos sobre el número de nucleótidos radiactivos incorporados en los RNA de diferente tamaño durante un pulso breve. Es evidente, a partir de estas gráficas, que ninguno de los hnRNA (fig. 11-17*a*) o el mRNA (fig. 11-17*b*) constituyen una fracción significativa del RNA en la célula. Si esto fuera así, debería existir una gran correspondencia entre las líneas azules y las rojas. De esta forma, a pesar de que los RNA mensajeros (y sus precursores heterogéneos nucleares de RNA) son sólo un pequeño porcentaje del RNA total de la mayoría de las células eucariotas, forman parte de un gran porcentaje de RNA sintetizados por la célula en cualquier momento (fig. 11-17*a*). Las razones de que existe poca o

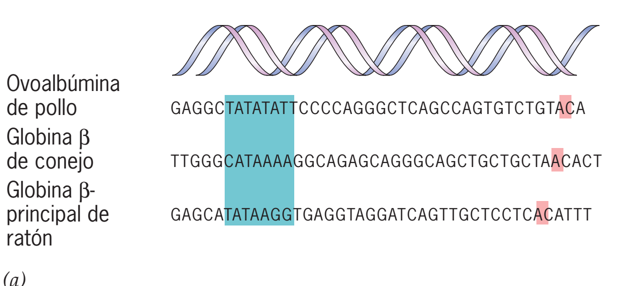
ninguna evidencia de los hnRNA y mRNA en las gráficas de densidad óptica de la figura 11-17 apuntan a que estos RNA se degradan después de lapsos relativamente breves. Esto es en particular cierto para los hnRNA, que se procesan en mRNA (o degradan por completo) incluso mientras se sintetizan. En cambio, los rRNA y tRNA tienen vida media que se mide en días o semanas y de manera gradual se acumula para convertirse en las especies predominantes en la célula. Cierta acumulación de radiactividad en los rRNA maduros 28S y 18S puede detectarse después de tres horas del pulso (fig. 11-17*b*). La vida media de los mRNA varía según sean las especies en particular: los límites oscilan entre unos 15 min y un periodo de días.

La maquinaria para la transcripción del mRNA

Todos los mRNA eucariotas precursores se sintetizan por la acción de una polimerasa de RNA II, una enzima compuesta de 12 subunidades diferentes muy conservadas, desde la levadura hasta los mamíferos. El inicio de la transcripción por medio de la polimerasa de RNA II se realiza con la cooperación de diferentes **factores transcripcionales generales** (**GTF**). Estas proteínas se conocen como factores de transcripción "generales" porque se requieren para asegurar la transcripción de diferentes ordenamientos de genes en una amplia variedad de organismos distintos. Los promotores de la polimerasa de RNA II se sitúan en el extremo 5′ de cada unidad de transcripción, pese a que la enzima establece contacto inicial en ambos lados del sitio de inicio de la transcripción (véase fig. 11-19*b*). En la gran mayoría de los genes estudiados, una porción crítica del promotor se localiza entre 24 y 32 bases corriente arriba del sitio donde se inicia la transcripción (fig. 11-18*a*). Esta región contiene a menudo una secuencia de consenso que es idéntica o muy similar al oligonucleótido 5′-TATAAA-3′ y se conoce como caja TATA. La caja TATA del DNA es el punto donde se ensambla el *complejo de preinicio* que contiene el GTF y la polimerasa. El complejo de preinicio debe ensamblarse antes de comenzar la transcripción del gen.

El primer paso en el ensamble del complejo de preinicio es la unión de una proteína, conocida como *proteína de unión a la caja TATA* (*TBP*), que reconoce a la caja TATA de los promotores eucariotas (fig. 11-18*b*). En consecuencia, como ocurre en las células procariotas, una polimerasa procariota purificada es incapaz por sí sola de reconocer un promotor de modo directo y no puede iniciar con precisión la transcripción. La TBP está presente como una subunidad de un complejo proteico mucho más grande llamado TFIID (del inglés *t*ranscription *f*actor for polymerase *II*, fraction *D*).[4] La cristalografía de rayos X ha revelado que la unión de la TBP al promotor de la polimerasa II causa una distorsión espectacular de la conformación del DNA. Como se muestra en la figura 11-19*a*, la TBP se inserta por sí misma dentro del surco menor de la doble hélice de DNA y

[4] La TBP es en realidad un factor transcripcional universal que media la unión de las tres polimerasas de RNA eucariotas conocidas. Está presente en una de las subunidades de los tres complejos diferentes conocidos de las proteínas. Como una subunidad del complejo TFIID, la TBP promueve la unión de la polimerasa de RNA II. Como una subunidad de las proteínas SL1 o TFIIB, la TBP promueve la unión de las polimerasas de RNA I y III, respectivamente. Un gran número de promotores carece de la caja TATA, pero es capaz de unir a la TBP.



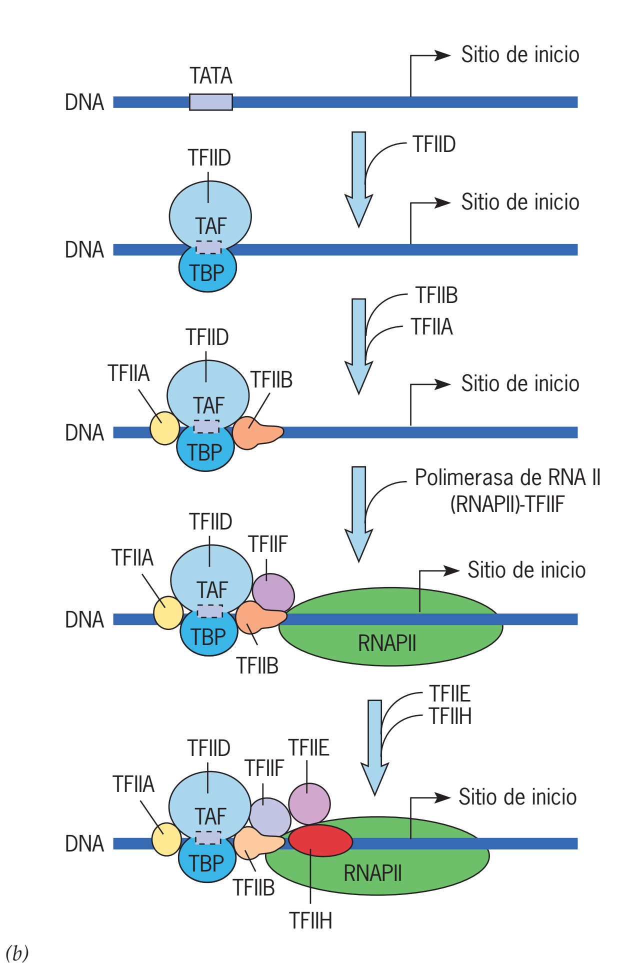
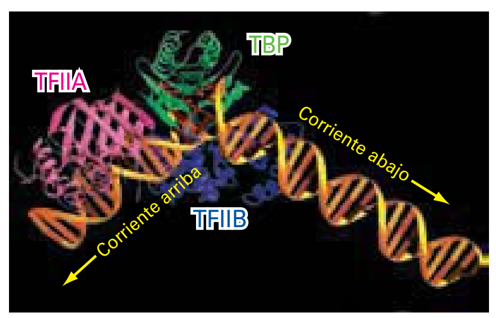
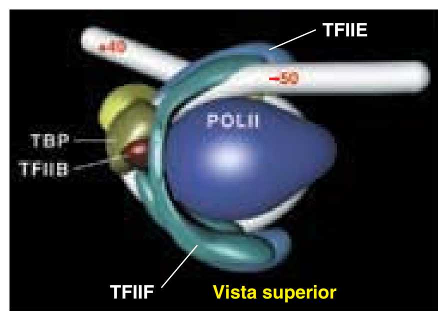
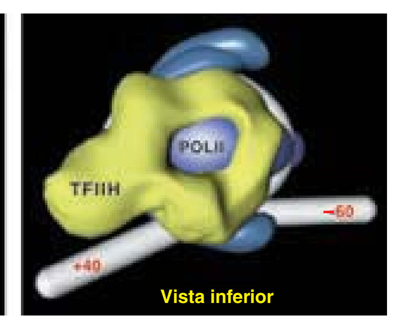


FIGURA 11-18 Inicio de la transcripción a partir de un promotor para la polimerasa II eucariota. *a*) Secuencia nucleotídica de la región corriente arriba del sitio donde se inicia la transcripción en tres genes eucarióticos diferentes. La caja TATA se indica por el cuadro sombreado en azul. Muchos promotores eucariotas contienen un segundo elemento promotor conservado llamado iniciador (Inr), que incluye el sitio donde comienza la transcripción (se muestra en naranja). Otros elementos promotores se muestran en la figura 12-41. *b*) Un modelo muy esquemático de los pasos en el ensamblaje del complejo de preinicio de la polimerasa de RNA II. La polimerasa se refiere como RNAPII; los otros componentes son los factores transcripcionales generales requeridos en el ensamble del complejo en su totalidad. El TFIID incluye una subunidad TBP, que se une de manera específica a la caja TATA y otras subunidades diferentes, que en su conjunto se conocen como factores relacionados con TBP (TAF). Al parecer, TFIIB provee un sitio de unión para la polimerasa de RNA. TFIIF se une a la polimerasa entrante. TFIIH contiene nueve subunidades, tres de las cuales poseen actividades enzimáticas.







(a) *(b)*

FIGURA 11-19 Modelos estructurales de la formación del complejo de preinicio. *a*) Modelo del complejo formado por el DNA y tres de los GTF, TBP de TFIID, TFIIA y TFIIB. La interacción entre la caja TATA y el TBP dobla al DNA cerca de 80° y permite que el TFIIB se una al DNA corriente arriba y abajo de la caja TATA. *b*) Vistas superior e inferior de un modelo del complejo de preinicio. A diferencia del modelo esquemático de la figura 11-18*b*, el DNA (que se muestra en blanco) se enrolla al parecer alrededor del complejo de preinicio de tal forma que los GTF pueden tener contacto con el DNA en ambos lados del sitio de inicio de la transcripción. (*A*, TOMADA DE GOURISANKAR GHOSH Y GREGORY D. VAN DUYNE, STRUCTURE 4:893, 1996; *B*, TOMADA DE M. DOUZIECH ET AL., MOL CELL BIOL 20:8175, 2000; CORTESÍA DE BENOIT COULOMBE.)

dobla a la molécula más de 80° en el sitio de interacción del DNA con la proteína.

La unión de TFIID da lugar a la etapa para el ensamble del complejo de preinicio completo, que tal vez ocurre paso a paso como aparece en la figura 11-18*b*. La interacción de las tres GTF (TBP de TFIID, TFIIA y TFIIB) con el DNA se muestra en la figura 11-19*a*. La presencia de estos tres GTF unidos al promotor provee una base para la unión posterior de la gran multisubunidad de la polimerasa de RNA con su TFIIF unido (fig. 11-18*b*). Una vez que la polimerasa de RNA-TFIIF se encuentra en posición, otro par de proteínas GTF (TFIIE y TFIIH) se une al complejo y convierte la polimerasa en la forma activa de la maquinaria de transcripción. En la figura 11-19*b* se muestra un modelo tridimensional del complejo de preinicio.

El TFIIH es el único GTF conocido que posee actividad enzimática. Una de las subunidades del TFIIH funciona como una cinasa de proteína para fosforilar a la polimerasa de RNA (se discute más adelante), aunque las otras dos subunidades de esta proteína funcionan como enzimas que desenrollan al DNA (helicasas). La actividad de helicasa de DNA es necesaria para separar las cadenas de DNA del promotor, lo que hace posible el acceso de la polimerasa a la cadena molde. Una vez que la transcripción comienza, algunos de los GTF (incluido el TFIID) pueden abandonarse al lado del promotor, mientras que otros se liberan del complejo (fig. 11-20). Cuanto más permanezca el TFIID unido al promotor, más moléculas de polimerasa de RNA pueden unirse al sitio promotor e iniciar nuevos procesos de transcripción sin retraso.

La región carboxilo terminal (CTD) de la subunidad más grande de la polimerasa de RNA II tiene una estructura poco común, que consiste en una secuencia de siete aminoácidos (-Tir1-Ser2-Pro3-Tre4-Ser5-Pro6-Ser7-) que se repite una y otra vez. En mamíferos, la CTD tiene 52 repeticiones de este heptapéptido. De los siete aminoácidos, las serinas 2 y 5 son las primeras candidatas para la fosforilación por cinasas de proteína. La polimerasa de RNA que se ensambla en el complejo de preinicio no se fosforila, en tanto que la misma enzima que se compromete con la transcripción está muy fosforilada; todos los grupos fosfato que se unen se hallan en la CTD (fig. 11-20). La fosforilación de la CTD pueden realizarla al menos cuatro cina-

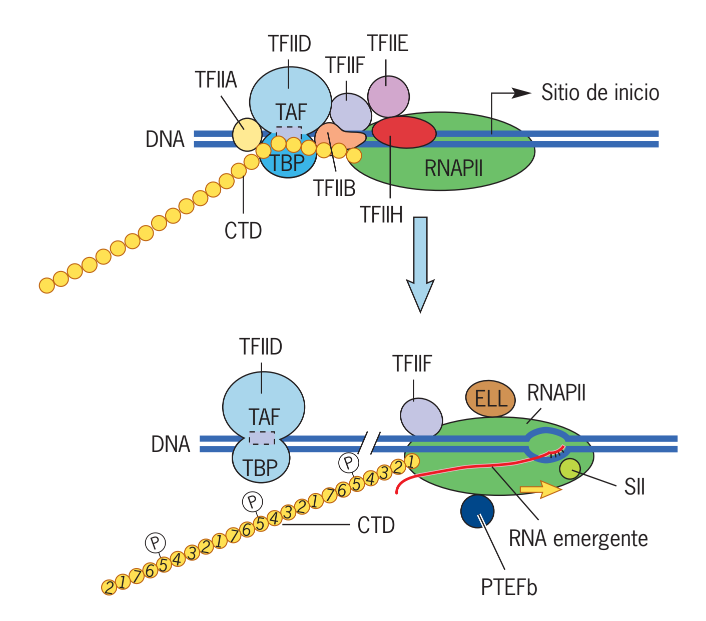


FIGURA 11-20 El inicio de la transcripción por medio de la polimerasa de RNA II se vincula con fosforilación del dominio C-terminal (CTD). El inicio de la transcripción se relaciona con la fosforilación de los residuos de serina en la posición 5 de cada repetido heptamérico del CTD. Se piensa que la fosforilación suministra la activación para la separación de la maquinaria transcripcional de los factores generales de la transcripción o del promotor del DNA. La salida a partir del promotor se acompaña de cambios principales en la conformación de la polimerasa, que la convierten de una enzima que "tiene problemas" para sintetizar RNA a una sumamente procesiva. SII, ELL y PTEFb son tres de los factores de elongación que se relacionan quizá con la polimerasa cuando ésta se mueve a lo largo del DNA. PTEFb es una cinasa que fosforila los residuos #2 de la serina del CTD después de comenzar la elongación (véase fig. 11-35).

sas diferentes, incluido el TFIIH. La fosforilación de la polimerasa puede actuar como activador que desacopla la enzima del GTF o el DNA promotor, lo que posibilita a la enzima escapar del complejo de preinicio y moverse corriente abajo en el DNA molde. Una polimerasa de RNA comprometida con la elongación puede relacionarse con diferentes proteínas accesorias grandes. De acuerdo con algunas estimaciones, una polimerasa de RNA en elongación es parte de un gran complejo constituido por más de 50 componentes y una masa molecular total de más de tres millones de daltones (véase fig. 11-35).

En conjunto, la polimerasa de RNA II y sus GTF son suficientes para promover un nivel basal bajo de transcripción de la mayoría de los promotores in vitro. Como se discute con detalle en el capítulo 12, diferentes factores de transcripción *específicos* son capaces de unirse a numerosos sitios en las regiones reguladoras del DNA. Estos factores de transcripción específicos pueden determinar: a) si un complejo de preinicio se ensambla o no en un promotor en particular, y b) la velocidad a la cual la polimerasa inicia nuevos ciclos de transcripción desde este promotor. Antes de analizar el mecanismo por medio del cual se generan los mRNA, primero se describe la estructura del mRNA así como las relaciones de algunos pasos en el procesamiento que se aclaran.

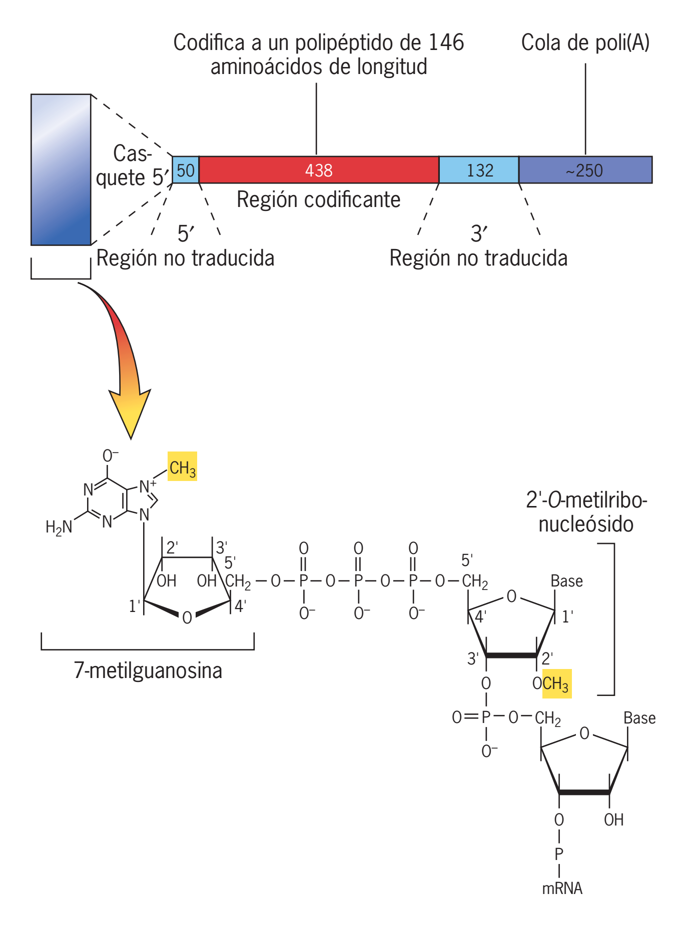


FIGURA 11-21 Estructura del mRNA de la globina beta humana. El mRNA contiene un casquete de metilguanosina 5′, regiones 5′ y 3′ no codificantes que flanquean al segmento codificante y una cola de poli(A) 3′. La longitud de cada segmento se refiere a varios nucleótidos. La longitud de la cola de poli(A) es variable. Por lo general comienza con una longitud de unos 250 nucleótidos y se reduce de forma gradual, como se discute en el capítulo 12. En esta figura se muestra la estructura del casquete 5′.

La estructura de los mRNA Los RNA mensajeros muestran ciertas propiedades:

1. Contienen secuencias continuas de nucleótidos que codifican un polipéptido específico.
2. Se encuentran en el citoplasma.
3. Se vinculan con los ribosomas cuando se traducen.
4. La mayoría de los mRNA contienen un segmento importante que no codifica, esto es, una porción que no codifica al ensamble de aminoácidos. Por ejemplo, cerca de 25% de cada RNA mensajero de globina consiste en regiones no codificantes ni traducidas (fig. 11-21). Las porciones no codificantes se encuentran en ambos extremos terminales 5′ y 3′ del RNA mensajero y contienen secuencias que ejercen funciones reguladoras de importancia (sección 12.6).
5. El RNA mensajero eucariota tiene modificaciones especiales en sus extremos 5′ y 3′ terminales que no se encuentran ni en los mensajeros procariotas ni en los RNA de transferencia o ribosomales. El extremo 3′ terminal del RNA mensajero de casi todos los organismos eucariotas posee una secuencia de 50 a 250 residuos de adenosina que forman una cola de poli(A), en tanto que el extremo 5′ tiene una tapa o "cap" de guanosina metilada (fig. 11-21).

Pronto se volverá a este tema para describir el modo en que los mRNA adquieren sus extremos 5′ y 3′ especializados. Sin embargo, primero es necesaria una breve desviación para comprender cómo se forman los mRNA en la célula.

Procesamiento de genes: un hallazgo inesperado

Tan pronto se descubrieron los hnRNA, se propuso que este grupo de RNA nucleares marcados con rapidez era el precursor de los RNA mensajeros citoplásmicos (pág. 444). El punto más importante fue la diferencia en el tamaño entre las dos poblaciones de RNA: los hnRNA fueron varias veces más grandes que los RNA mensajeros (fig. 11-22). ¿Por qué deberían las células sintetizar grandes moléculas precursoras de las versiones más pequeñas? Estudios iniciales sobre el procesamiento del RNA ribosomal habían mostrado que los RNA maduros procedían de grandes precursores. Hay que recordar que se removieron grandes segmentos a partir de los extremos 5′ y 3′ de diferentes rRNA intermediarios (fig. 11-14) para generar al final un rRNA maduro. Con base en el esquema anterior se pensaba que la célula seguía una vía similar para el procesamiento de hnRNA para formar los RNA mensajeros. Empero, los RNA mensajeros constituyen poblaciones mucho más diversas que dificultan seguir sus pasos durante el procesamiento de una sola especie de RNA mensajero, como se había ensayado para los rRNA. El problema lo resolvió un descubrimiento inesperado.

Hasta el año de 1977 los biólogos moleculares asumían que una secuencia lineal y continua de nucleótidos en un RNA

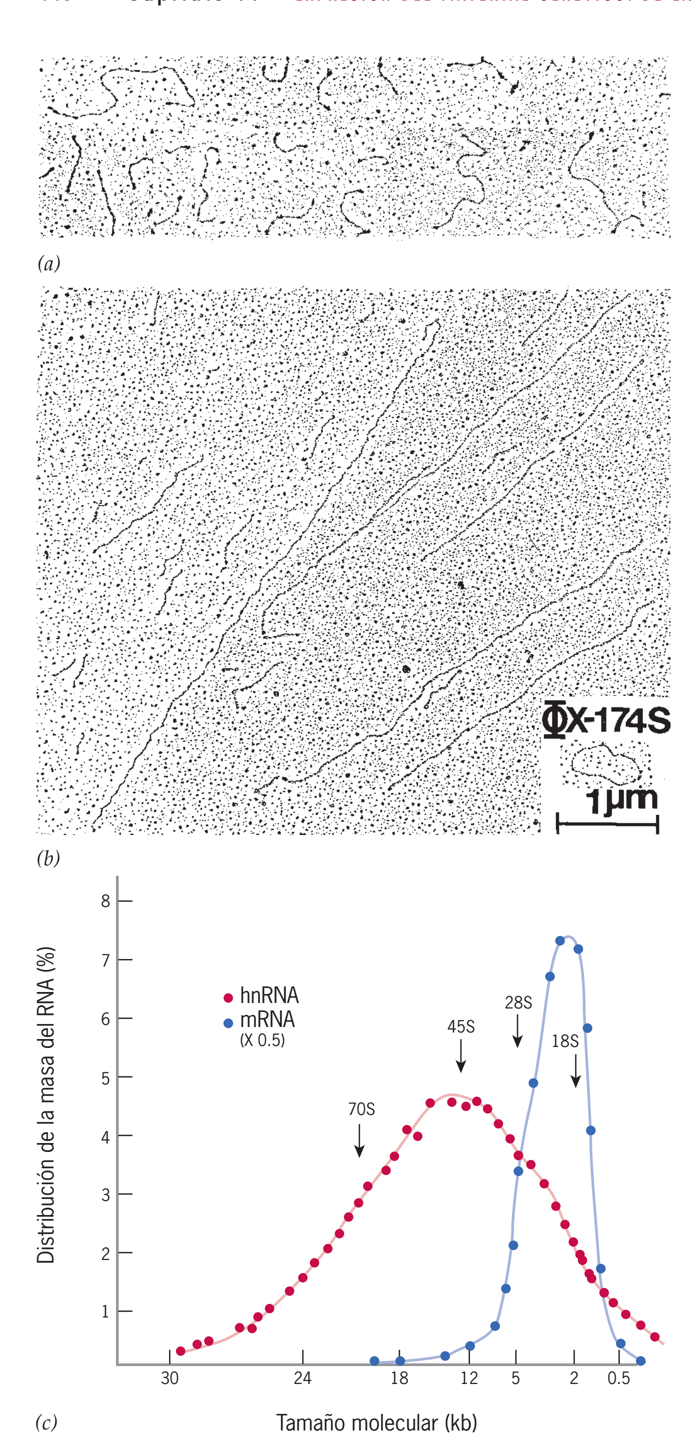


FIGURA 11-22 Diferencia de tamaño entre los hnRNA y los mRNA. *a* y *b*), Micrografías electrónicas de preparaciones sombreadas con polvo de metal de moléculas de poli(A)-mRNA *a* y poli(A)-hnRNA *b*. Aquí se muestran los tamaños representativos de cada tipo. La molécula de referencia es un DNA viral de ϕX-174. *c*) Distribuciones en tamaño del hnRNA y el mRNA de células L de ratón que se determinan por sedimentación en gradiente de densidad. La línea roja representa el hnRNA que se marca con suma rapidez, mientras que la línea púrpura representa el mRNA aislado de polirribosomas después de un periodo de cuatro horas de marcaje. Las abscisas se han convertido de una fracción de número (indicado por los puntos) al tamaño molecular por calibración de los gradientes. (Tomada de John A. Bantle y William E. Hahn, Cell 8:145, 1976; con autorización de Cell Press.)

mensajero era complementaria de una secuencia continua de nucleótidos en una cadena del DNA de un gen. Entonces, en ese año, Phillip Sharp y sus colegas del *Massachusetts Institute of Technology* y Richard Roberts, Louise Chow y sus colaboradores de los *Cold Spring Harbor Laboratories* de Nueva York realizaron un importante hallazgo. Estos investigadores encontraron que los mRNA estudiados se transcribían a partir de segmentos de DNA separados unos de otros a lo largo de la cadena molde.

Las primeras observaciones en verdad relevantes se hicieron durante el análisis de transcripción del genoma de adenovirus. El adenovirus es un patógeno capaz de infectar a gran número de células de mamífero. Se encontró que un número de RNA mensajeros de diferentes adenovirus tenía el mismo extremo 5′ terminal de 150 a 200 nucleótidos. Era de esperar que tal secuencia líder representara un segmento repetido de nucleótidos localizados cerca de la región promotora de cada uno de los genes que codifican a estos RNA mensajeros. Sin embargo, análisis posteriores revelaron que la secuencia líder 5′ no es complementaria de una secuencia repetida y, aún más, ni siquiera es complementaria de un tramo continuo de nucleótidos en el DNA molde. En lugar de ello, la secuencia principal se transcribe a partir de tres segmentos de DNA distintos y separados (representados por los bloques x, y, y z en la figura 11-23). Las regiones del DNA situadas entre estos segmentos, conocidas como **secuencias interpuestas** (I_1 a I_3 en la figura 11-23), están ausentes por alguna razón en el RNA mensajero correspondiente. Se podría argüir que la presencia de secuencias interpuestas es una peculiaridad de los genomas virales, pero esta observación básica pronto se amplió a los propios genes celulares.

En 1977, Alec Jeffreys y Richard Flavell en los Países Bajos y Pierre Chambon en Francia notificaron por primera vez la presencia de secuencias interpuestas en genomas celulares no virales. Jeffreys y Flavell descubrieron una secuencia interpuesta de unas 600 bases situada directamente dentro de una parte del gen de la globina que codifica a la secuencia aminoacídica del polipéptido globina (fig. 11-24). La base de este hallazgo se discute en la figura. Pronto se reconocieron las secuencias interpuestas en otros genes y fue evidente que la presencia de genes con estas secuencias interpuestas, llamados **genes de procesamiento** de corte y empalme, es la regla y no la excepción. Las partes de un gen de procesamiento de corte y empalme que contribuyen a la maduración del producto de RNA se conocen como **exones**, en tanto que las secuencias interpuestas se denominan **intrones**. Los genes de procesamiento de corte y empalme se distribuyen con amplitud en los eucariotas, si bien los intrones de los eucariotas más simples (p. ej., levaduras y nematodos) casi siempre muestran un número y tamaño menores respecto de los más complejos de plantas y animales. Los intrones se encuentran en todos los tipos de genes, incluidos los que codifican a los RNA de transferencia, RNA ribosomales y RNA mensajeros.

El descubrimiento de genes con intrones dio paso inmediato a preguntarse de qué forma estos genes eran capaces de producir los RNA mensajeros sin estas secuencias. Una posibilidad era que las células generaran una transcripción primaria correspondiente a toda la unidad de transcripción y que las porciones de RNA correspondientes a los intrones de DNA se eliminaran de alguna manera. Si era ese el caso, entonces en la transcripción primaria deberían estar presentes los segmentos correspondientes de los intrones. Tal razonamiento debía también explicar el tamaño mucho mayor de las moléculas de los

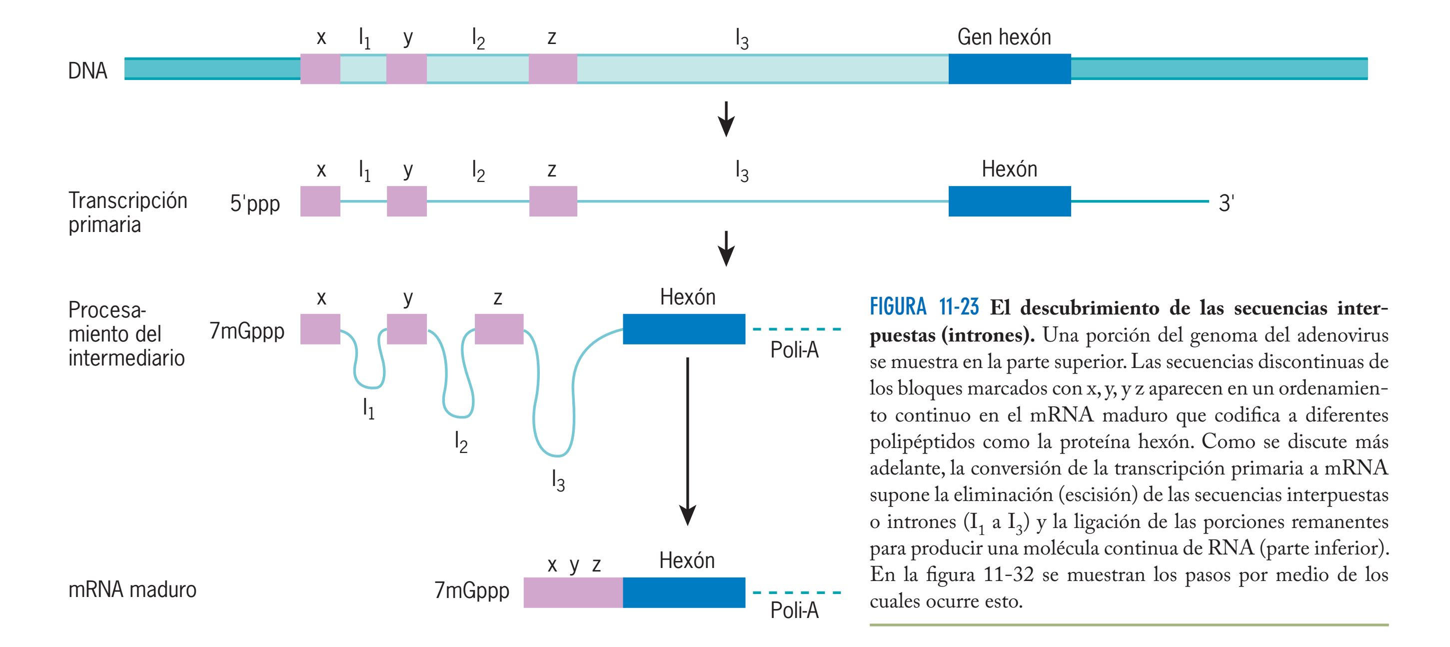


FIGURA 11-23 El descubrimiento de las secuencias interpuestas (intrones). Una porción del genoma del adenovirus se muestra en la parte superior. Las secuencias discontinuas de los bloques marcados con x, y, y z aparecen en un ordenamiento continuo en el mRNA maduro que codifica a diferentes polipéptidos como la proteína hexón. Como se discute más adelante, la conversión de la transcripción primaria a mRNA supone la eliminación (escisión) de las secuencias interpuestas o intrones (I_1 a I_3) y la ligación de las porciones remanentes para producir una molécula continua de RNA (parte inferior). En la figura 11-32 se muestran los pasos por medio de los cuales ocurre esto.

hnRNA en comparación con las moléculas del RNA mensajero que al final generan.

La investigación enfocada en el RNA nuclear ha continuado en los últimos años a tal grado que se han determinado las dimensiones de unos cuantos RNA mensajeros (**pre-mRNA**). Por ejemplo, se observó que la secuencia de globina está presente en una molécula de RNA nuclear que se sedimenta a 15S, a diferencia del RNA mensajero de la globina final cuyo coeficiente de sedimentación es de 10S. Para ello se usó una técnica ingeniosa (conocida como formación del asa R) que emplearon Shirley Tilghman, Philip Leder y colaboradores de los *National Institutes of Health* para determinar la relación física entre los RNA de globina 15S y 10S y generar información sobre la transcripción de los genes procesados.

Hay que recordar la evidencia analizada en la página 403, según la cual las cadenas simples de DNA complementario pueden unirse de manera específica entre sí. También pueden enlazarse entre sí el DNA de cadena única y las moléculas de RNA, siempre que tengan secuencias complementarias de nucleótidos; ésta es la base de la técnica de hibridación DNA-RNA analizada en la sección 18.11 (el complejo DNA-RNA se conoce como *híbrido*). Tilghman y colaboradores recurrieron a la microscopia electrónica para examinar los fragmentos de DNA del gen de la globina hibridado con el RNA de la globina 15S. Se advir-

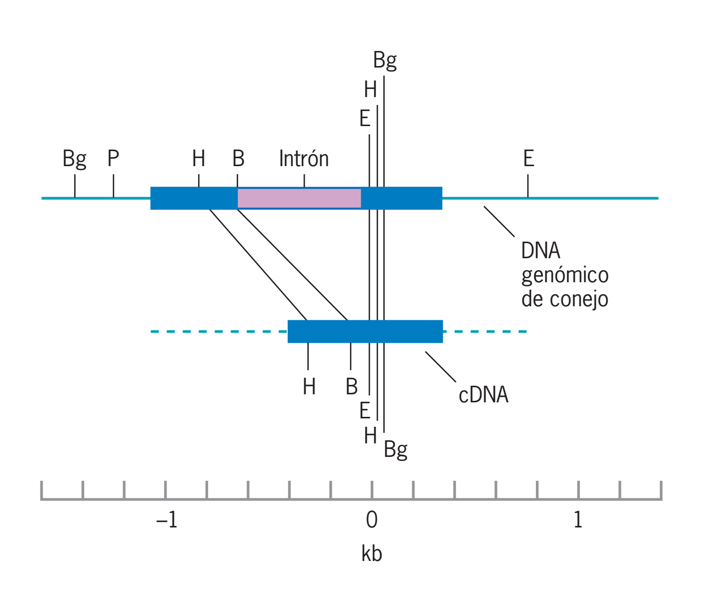
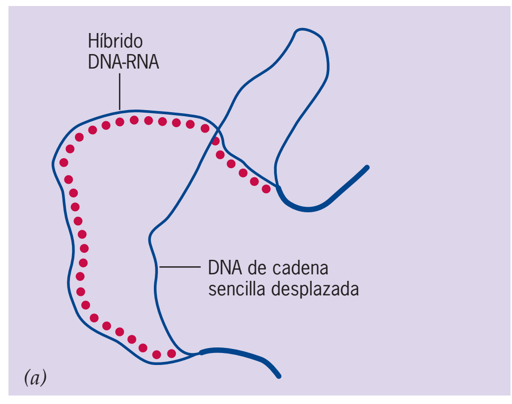
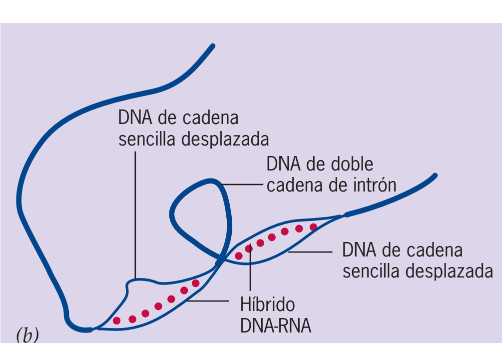
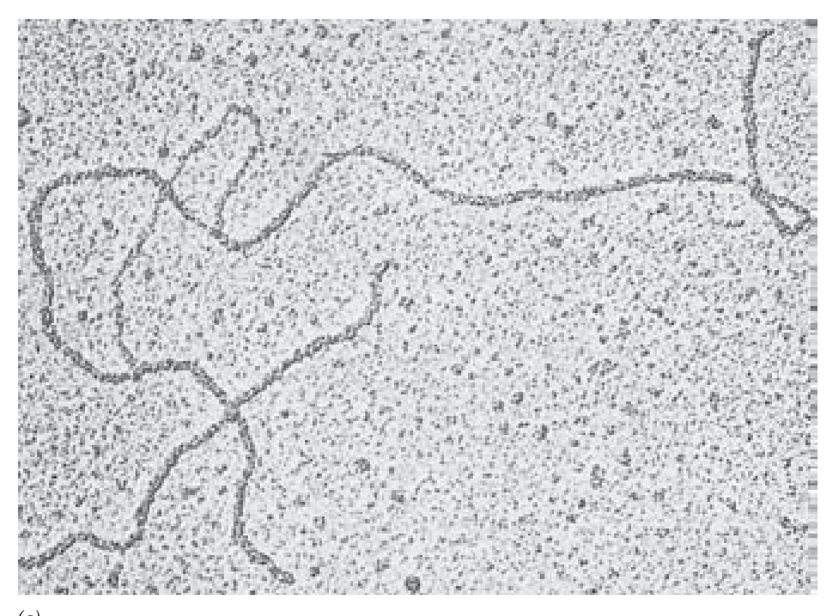


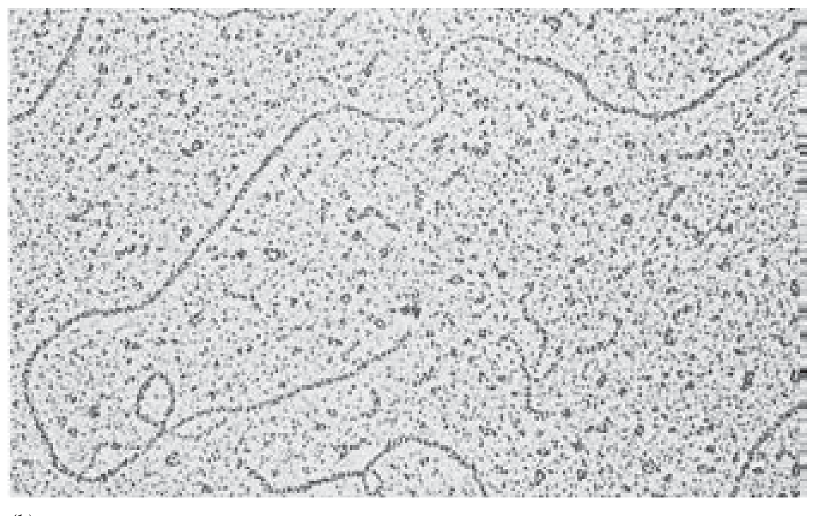
FIGURA 11-24 El descubrimiento de los intrones en un gen eucariota. Como se analiza en el capítulo 18, las bacterias tienen enzimas de restricción que reconocen y cortan las moléculas de DNA en un sitio de ciertas secuencias nucleotídicas. El dibujo muestra un mapa de sitios de restricción de enzimas de corte en la región del gen de la globina beta de conejo (parte superior) y el mapa correspondiente de un cDNA preparado a partir del mRNA de la globina beta (inferior). (Un cDNA es un DNA conformado in vitro a través de la enzima transcriptasa inversa mediante un mRNA usado como molde. De esta forma, el cDNA tiene la secuencia complementaria del mRNA. El cDNA se ha utilizado para este experimento debido a que las enzimas de restricción no cortan los RNA.) Las letras indican los sitios en los cuales diferentes enzimas de restricción cortan los dos DNA. El mapa superior muestra que el gen de la globina contiene un sitio de restricción para la enzima *Bam*H1 (B) localizada unos 700 pares de bases desde un sitio de restricción para la enzima *Eco*R1 (E). Cuando el cDNA de la globina se trató con estas mismas enzimas (mapa inferior), los sitios correspondientes B y E estuvieron separados sólo por 67 nucleótidos. Es evidente que el DNA preparado a partir del genoma tiene una región que está ausente del cDNA correspondiente (y por lo tanto está ausente del mRNA a partir del cual se generó el cDNA). La secuencia completa del gen de la globina que se muestra después contiene un segundo intrón más pequeño. (TOMADA DE A. J. JEFFREYS Y R. A. FLAVELL, CELL 12:1103, 1977; CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS.)







(a)



(b)

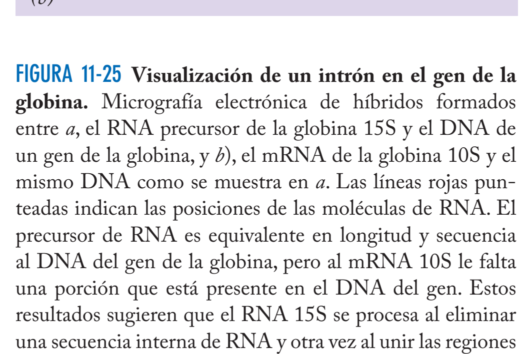


FIGURA 11-25 Visualización de un intrón en el gen de la globina. Micrografía electrónica de híbridos formados entre *a*, el RNA precursor de la globina 15S y el DNA de un gen de la globina, y *b*), el mRNA de la globina 10S y el mismo DNA como se muestra en *a*. Las líneas rojas punteadas indican las posiciones de las moléculas de RNA. El precursor de RNA es equivalente en longitud y secuencia al DNA del gen de la globina, pero al mRNA 10S le falta una porción que está presente en el DNA del gen. Estos resultados sugieren que el RNA 15S se procesa al eliminar una secuencia interna de RNA y otra vez al unir las regiones flanqueadoras. (Tomada de Shirley M. Tilghman et al., Proc Nat'l Acad Sci USA 75:1312, 1978.)

tió que el híbrido poseía una doble cadena continua del complejo DNA-RNA (líneas punteadas rojas y azules de la figura 11-25*a*). En cambio, cuando el mismo fragmento de DNA se incubó con el RNA mensajero de la globina madura 10S, un largo segmento de DNA en el centro de la región codificante se reconoció como una protuberancia que formaba un asa de doble cadena (fig. 11-25*b*). El asa resultante estaba formada por un gran intrón en el DNA que no fue complementario en ninguna parte del RNA mensajero pequeño de la globina. Fue evidente que el RNA 15S contenía los segmentos correspondientes a los intrones de los genes que se remueven durante la formación del RNA mensajero 10S.

Más o menos al mismo tiempo se efectuó un experimento similar de hibridación entre el DNA que codifica a la ovoalbúmina, una proteína que se encuentra en los huevos de la gallina, y su correspondiente mRNA. El DNA de ovoalbúmina y el RNA mensajero híbrido contienen siete asas distintas que corresponden a siete intrones (fig. 11-26). En conjunto, los intrones representan cerca de tres veces el DNA presente en las ocho porciones codificantes combinadas (exones). Estudios posteriores han revelado que los exones individuales promedian alrededor de 150 nucleótidos. En cambio, los intrones individuales tienen cerca de 3 500 nucleótidos, lo cual explica por qué las moléculas de hnRNA son mucho más largas que los mRNA. Para citar dos casos extremos, el gen de la distrofina humana tiene 100 veces la longitud necesaria para codificar a su correspondiente mRNA y el gen de la colágena tipo I contiene más de 50 intrones. Un gen humano contiene en promedio cerca de nueve intrones.

Estos y otros hallazgos representan una sólida evidencia para la propuesta según la cual la formación del RNA mensajero en células eucariotas sucede por la remoción de las secuencias internas de ribonucleótidos de un pre-mRNA mucho más largo. A continuación se analizan los pasos de este proceso.

El procesamiento de los mRNA eucariotas

La polimerasa de RNA II genera una transcripción primaria complementaria del DNA de toda la unidad de transcripción. El

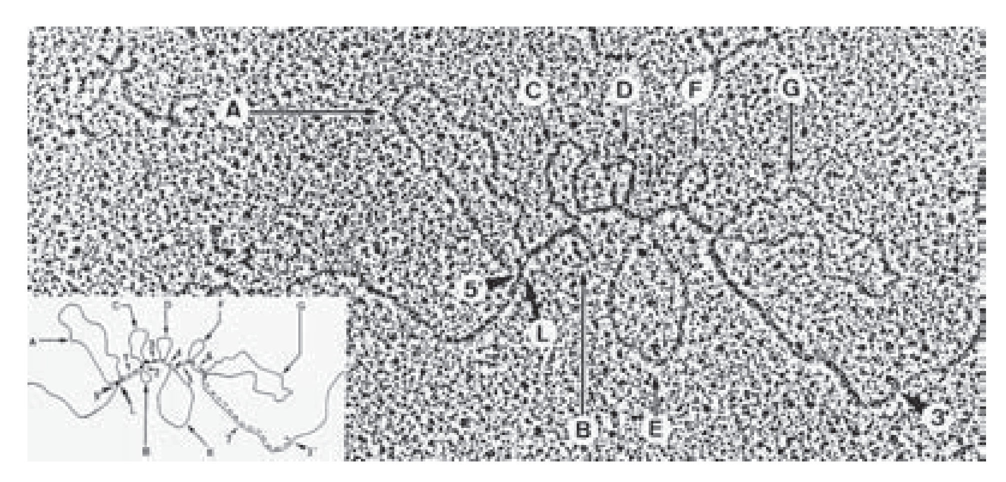


FIGURA 11-26 Visualización de los intrones en el gen de la ovoalbúmina. Micrografía electrónica de un híbrido formado entre el mRNA de la ovoalbúmina y un fragmento del DNA genómico de pollo que contiene el gen de la ovoalbúmina. El híbrido que se muestra en esta micrografía es similar en naturaleza al de la figura 11-25*b*. En ambos casos, el DNA contiene la secuencia entera del gen debido a que se aisló directamente del genoma. En cambio, el RNA se ha procesado por completo y las porciones que se transcribieron de los intrones se removieron. Cuando el DNA genómico y el mRNA se hibridan, las porciones del DNA que no están representadas en el mRNA forman asas. En esta figura se pueden observar las asas de siete intrones (A-G). (CORTESÍA DE PIERRE CHAMBON.)

examen mediante microscopia electrónica de genes capaces de transcribir indica que las transcripciones de RNA se vinculan con diferentes proteínas y numerosas partículas distintas, mientras aún se encuentran en proceso de síntesis (fig. 11-27). Estas partículas, que consisten en proteínas y ribonucleoproteínas, incluyen a los agentes encargados de convertir la transcripción primaria en un RNA mensajero maduro. Este proceso de conversión requiere la adición de la estructura cap (casquete) en el extremo 5′ y una cola de poli(A) en los extremos 3′ de la transcripción, además de la eliminación de cualquier secuencia de intrón. Una vez completo el procesamiento, el mRNP, que consta de RNA y proteínas relacionadas, está listo para exportarse del núcleo.

Extremos 5′ y colas de poli(A) Los extremos 5′ de todos los RNA poseen de manera primaria un trifosfato derivado del primer trifosfato de nucleósido incorporado en el sitio de inicio de la síntesis de RNA. Una vez que el 5′ terminal de un precursor de RNA mensajero se sintetiza, diferentes actividades

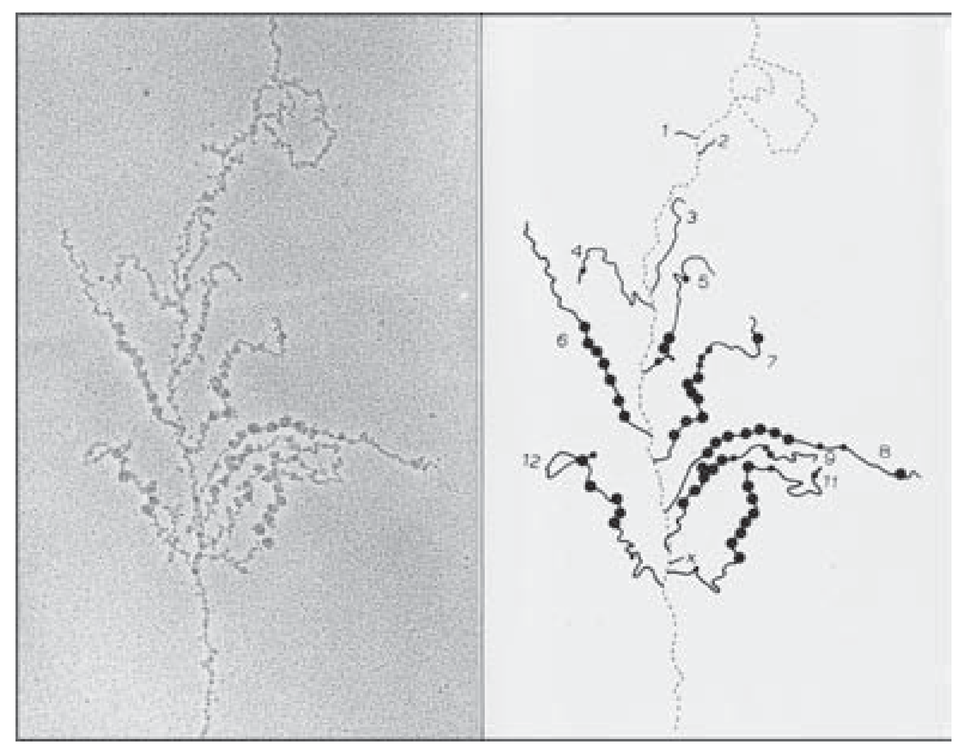
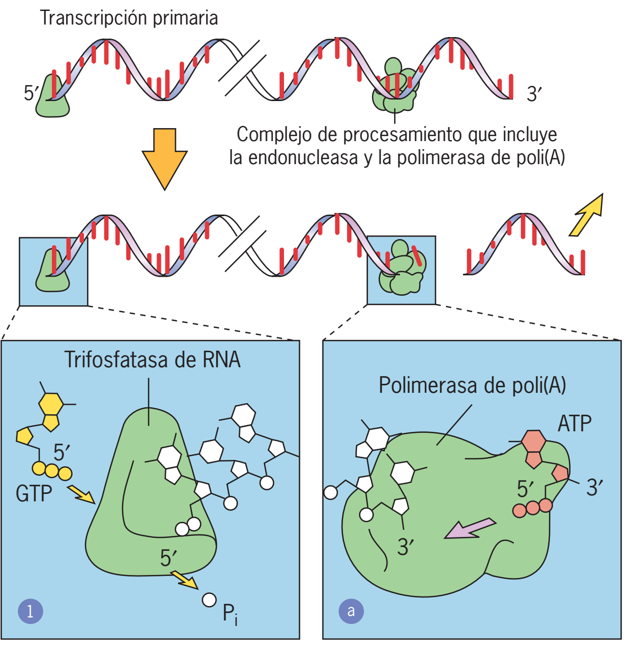
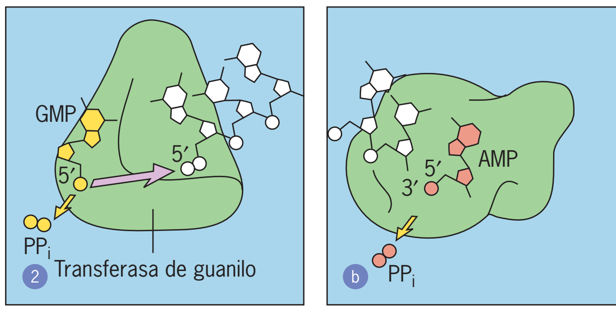
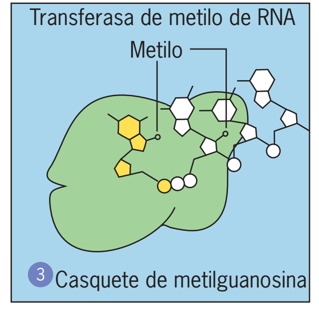


FIGURA 11-27 Las transcripciones del pre-mRNA se procesan conforme se sintetizan (esto es, en sentido cotranscripcional). *a*) Micrografía electrónica de una unidad de transcripción no ribosomal que muestra la presencia de partículas de ribonucleoproteínas unidas a las transcripciones del RNA naciente. *b*) Dibujo que trata de interpretar la micrografía que se muestra en la parte *a*. La línea punteada representa la tira de cromatina (DNA), las líneas sólidas las fibrillas de ribonucleoproteína (RNP) y los círculos sólidos las partículas RNP relacionadas con las fibrillas. Para numerar las transcripciones individuales, se empieza con el más cercano al punto de inicio. Las partículas RNP no se distribuyen de modo aleatorio a lo largo de la transcripción emergente, sino que se unen a sitios específicos donde el procesamiento del RNA se realiza. (TOMADA DE ANN L. BEYER, OSCAR L. MILLER, JR. Y STEVEN L. MCKNIGHT, CELL 20:78, 1980; CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS.)

enzimáticas actúan en este extremo de la molécula (fig. 11-28). En un primer paso, el último de los tres fosfatos se remueve y convierte el extremo 5′ terminal en un difosfato (paso 1, fig. 11-28). Entonces se adiciona un GMP en orientación *invertida* de tal modo que el extremo 5′ terminal de la guanosina se halla frente al extremo 5′ de la cadena de RNA (paso 2, fig. 11-28). Como resultado, los dos primeros nucleósidos se encuentran unidos por un puente 5′-5′ de trifosfato poco usual. Por último, la región terminal invertida de la guanosina se metila en la posición 7 en su base de guanina, mientras el nucleótido en la cadena interna del puente de trifosfato lo hace en posición 2′ de la ribosa (paso 3, fig. 11-28). El extremo 5′ del RNA contiene entonces un **capuchón de metilguanosina** (mostrado con mayor detalle en la figura 11-21). Estas modificaciones enzimáticas del extremo 5′ de la transcripción primaria ocurren con gran rapidez, mientras que la molécula de RNA continúa en su estado temprano de síntesis. De hecho, la CTD de la polimerasa recluta a las enzimas que realizan el *capping* (del inglés "capuchón") (véase fig. 11-35). El capuchón de metilguanosina en el extremo 5′ de un mRNA tiene diferentes funciones: previene que las exonucleasas digieran al extremo 5′ del mRNA, favorece el transporte del mRNA fuera del núcleo y tiene un papel importante en el inicio de la traducción del mRNA.







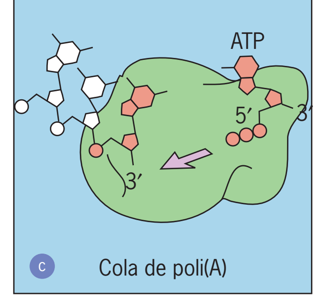


FIGURA 11-28 Pasos en la adición de un casquete de metilguanosina 5′ y una cola de poli(A) en el extremo 3′ de un pre-mRNA. El extremo 5′ de un pre-mRNA naciente se une a una enzima de casquete, la cual en los mamíferos tiene dos sitios activos que catalizan reacciones diferentes: una trifosfatasa que remueve al grupo fosfato terminal (paso 1) y una transferasa de guanililo que adiciona un residuo de guanina en orientación inversa, por medio de un enlace 5′-a-5′ (paso 2). En el paso 3, diferentes transferasas de metilo agregan un grupo metilo al casquete de guanosina terminal y la ribosa del nucleótido colocado en el extremo del RNA emergente. Un complejo proteico (llamado CBC) se une al casquete (no se muestra). Una serie de sucesos muy diferentes ocurre en el extremo 3′ del pre-mRNA, donde un complejo grande de proteínas se ensambla. Primero, una endonucleasa corta la transcripción primaria de RNA y genera un nuevo extremo 3′. En los pasos a-c, una polimerasa de poli(A) añade residuos de adenosina al extremo 3′ sin intervención de un molde de DNA. Un mRNA característico de mamífero contiene 200 a 250 residuos de adenosina en su cola completa de poli(A); el número es considerablemente menor en eucariotas inferiores. (Según D. A. Micklos y G. A. Freyer, DNA Science, Carolina Biological Supply Co.)

Como se ha visto, el extremo 3′ de un RNA mensajero contiene una cadena de residuos de adenosina que forma una **cola de poli(A)**. Conforme se secuenciaron diferentes RNA mensajeros resultó evidente que la cola de poli(A) comienza invariablemente unos 20 nucleótidos corriente abajo de la secuencia AAUAAA. En la transcripción primaria esta secuencia sirve como sitio de reconocimiento para el ensamble de un complejo de proteínas que realizan mecanismos de procesamiento en el extremo 3′ del RNA mensajero (fig. 11-28). El complejo de procesamiento del ensamblado de poli(A) también se relaciona de manera física con la polimerasa de RNA cuando ésta sintetiza la transcripción primaria (véase fig. 11-35).

Dentro de las proteínas del complejo de procesamiento se encuentra una endonucleasa (fig. 11-28, parte superior), que corta a la molécula de pre-mRNA corriente abajo respecto del sitio de reconocimiento. Luego del corte por la nucleasa, una enzima conocida como *polimerasa de poli(A)* agrega 250 o más adenosinas sin la necesidad de un molde (pasos a-c, fig. 11-28). Como se señala en la sección 12.6, la cola de poli(A) junto con una proteína adjunta protegen al mRNA de la degradación prematura por exonucleasas. Las colas de poli(A) también son útiles para los biólogos moleculares interesados en aislar los mRNA. Cuando una mezcla de RNA celulares se pasa a través de una columna que contiene unidos polinucleótidos sintéticos poli(T), los mRNA se unen entonces a la columna y se extraen de la solución, mientras que los más abundantes, tRNA, rRNA y snRNA, que no poseen colas de poli(A), pasan a través de la columna y se desechan con el solvente acuoso.

Procesamiento del RNA: remoción de intrones de un pre-mRNA

Los pasos clave en el procesamiento del pre-mRNA se muestran en la figura 11-29. Además de la formación del

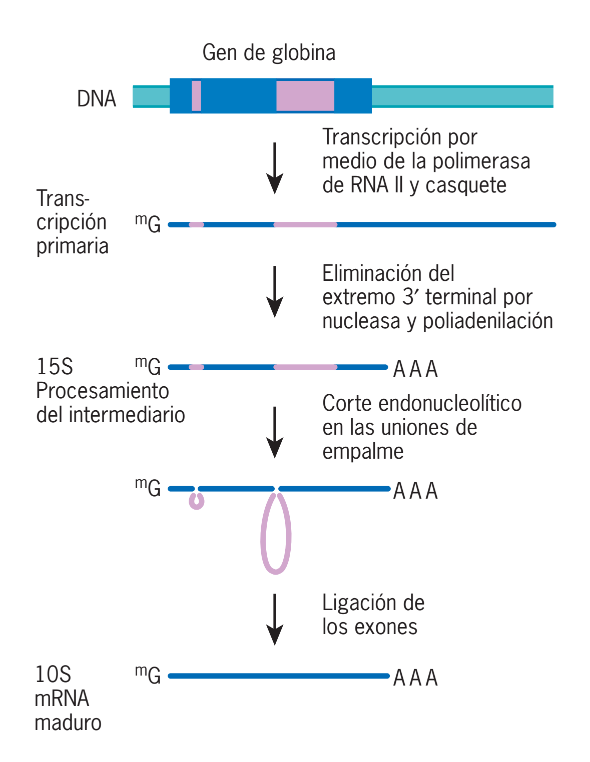


FIGURA 11-29 Sinopsis de los pasos durante el procesamiento del mRNA de la globina. Los intrones se muestran en púrpura, mientras que las porciones azul oscuro del gen aluden a las posiciones de los exones, que son las secuencias de DNA representadas en el RNA mensajero maduro.

casquete 5′ y la cola de poli(A), ya descrita, otras partes de una transcripción primaria que corresponden a las secuencias intrónicas deben eliminarse por un proceso complejo denominado ***splicing* del RNA**. Para procesar un RNA deben efectuarse cortes en la cadena de ese RNA en los extremos 5′ y 3′ (o **sitios de *splicing***) de cada intrón y los exones situados a cada lado de los sitios de *splicing* deben unirse de nueva cuenta de manera covalente (ligados). Es importante que el procesamiento ocurra con exactitud, debido a que la adición o pérdida de un solo nucleótido en cualesquiera de las uniones de *splicing* podría causar que el mRNA resultante se tradujera de modo equívoco.

¿De qué manera la maquinaria básica de *splicing* reconoce las uniones exón-intrón en miles de diferentes pre-mRNA? El análisis de cientos de uniones entre los exones e intrones en eucariotas, desde las levaduras y los insectos hasta los mamíferos, revela la presencia en los sitios de *splicing* de una secuencia nucleotídica conservada y originada en la evolución ancestral. En la figura 11-30 se muestra la secuencia identificada más a menudo en los bordes de la unión exón-intrón de las moléculas de pre-mRNA de mamífero. El G/GU en el sitio 5′ terminal del intrón (*sitio de splicing 5′*), el AG/G en el extremo 3′ del intrón (*sitio de splicing 3′*) y la *secuencia de polipirimidinas* cercana al sitio de *splicing* 3′ están presentes en la gran mayoría de las moléculas de pre-mRNA eucariotas.[5] Además, las regiones adyacentes del intrón contienen nucleótidos preferidos, como se indica en la figura 11-30, los cuales poseen una función relevante en el reconocimiento del sitio de *splicing*. Las secuencias ilustradas en la figura 11-30 funcionan siempre como reconocimiento de los sitios de *splicing*, pero no son suficientes. Por lo general, los intrones se presentan en la forma de miles de nucleótidos y a menudo contienen segmentos internos que semejan la secuencia de consenso mostrada en la figura 11-30, si bien las células no los reconocen como señales de *splicing* y por consecuencia los ignoran. La adición de señales que permiten a la maquinaria de *splicing* distinguir entre exones e intrones se debe quizás a secuencias específicas (llamadas *aumentadores del splicing exónico* o *ESE*), situadas dentro de los exones (fig. 11-32, recuadro A). Los cambios en la secuencia de DNA dentro del sitio de *splicing* o en un ESE pueden llevar a la inclusión de un intrón o la exclusión de un exón. Se estima que más de 15% de las enfermedades humanas hereditarias se debe a mutaciones que alteran el *splicing* del pre-mRNA.

El entendimiento del *splicing* del RNA ha delineado una mejor idea de las capacidades de las moléculas del RNA. Thomas Cech y sus colegas de la *University of Colorado* obtuvieron en 1982 la primera evidencia de que las moléculas de RNA eran capaces de catalizar reacciones químicas. Como se discute de forma más extensa en la sección Vías experimentales de este capítulo, estos investigadores encontraron que el protozoario ciliado *Tetrahymena* sintetizaba un rRNA precursor (un pre-rRNA) capaz de autoprocesarse. Además de la reveladora existencia de los RNA enzimáticos, o **ribozimas**, tales experimentos cambiaron el pensamiento de los biólogos acerca de los esenciales papeles del RNA y las proteínas en el mecanismo del procesamiento del RNA.

[5] Alrededor de 1% de los intrones tiene dinucleótidos AT y AC en sus extremos 5′ y 3′ (más que GU y AG). Estos intrones AT/AC se procesan por un tipo diferente de espliceosoma, conocido como espliceosoma U12 debido a que contiene snRNA U12 en lugar del snRNA U2 del espliceosoma principal.

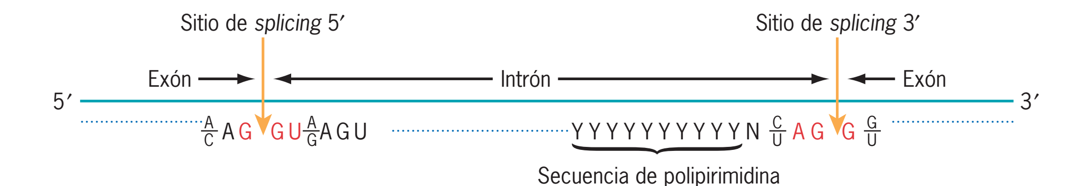
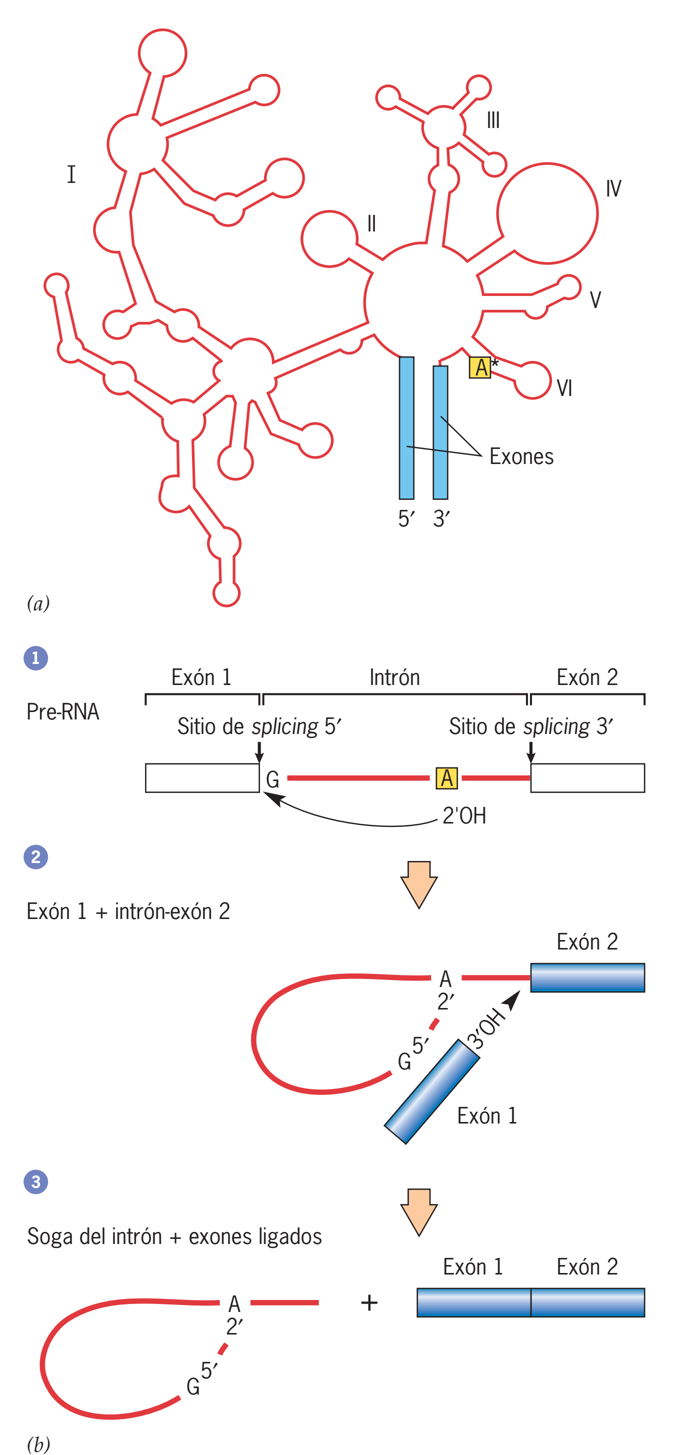


FIGURA 11-30 Secuencias nucleotídicas en los sitios de *splicing* del pre-mRNA. Las secuencias nucleotídicas mostradas en las regiones de los sitios de *splicing* están basadas en el análisis de un gran número de pre-mRNA y por tanto se refieren como secuencias de *consenso*. Las bases que se muestran en naranja virtualmente no varían y las que aparecen en negro representan las bases preferidas en estas posiciones. N representa cualesquiera de los cuatro nucleótidos mientras que Y es una pirimidina. La secuencia de polipirimidina cercana al sitio de *splicing* 3′ casi siempre contiene entre 10 y 20 pirimidinas.

Los intrones del pre-rRNA de *Tetrahymena* son un ejemplo de los *intrones del grupo I*, que se discuten más adelante. Otro tipo de intrones que efectúan auto-*splicing*, llamados *intrones del grupo II*, se descubrió después en mitocondrias de hongos, cloroplastos de plantas y una amplia variedad de bacterias y arqueas. Los intrones del grupo II se pliegan en una estructura compleja que se muestra en dos dimensiones en la figura 11-31*a*. Los intrones del grupo II sufren un auto-*splicing* al pasar por un estado intermedio, conocido como *lazo* (fig. 11-31*b*), debido a que semeja la soga utilizada por los vaqueros para lazar vacas.



El primer paso en el procesamiento de los intrones del grupo II es el corte del sitio de procesamiento 5′ (paso 1, fig. 11-31*b*), seguido por la formación de un lazo por medio de un enlace covalente entre el 5′ terminal del intrón y un residuo de adenosina cercano al 3′ terminal del intrón (paso 2). El corte posterior del sitio de procesamiento 3′ libera el lazo y hace posible el corte de los extremos del exón para que se unan de modo covalente (ligados) (paso 3).

Los pasos llevados a cabo durante la remoción de los intrones de las moléculas de pre-mRNA en células animales son muy similares a los pasos observados en los intrones del grupo II. La diferencia primaria radica en que los pre-mRNA no son capaces de procesarse por sí mismos y requieren un grupo de **pequeños RNA nucleares** (**snRNA**) y sus proteínas vinculadas. Cada molécula larga de hnRNA se transcribe y relaciona con un gran número de proteínas para formar un **hnRNP** (**ribonucleoproteína nuclear heterogénea**), la cual representa el sustrato para las reacciones de procesamiento siguientes. El procesamiento que ocurre en cada intrón del pre-mRNA se vincula con un complejo macromolecular llamado espliceosoma. Cada **espliceosoma** posee diferentes proteínas y un número de distintas partículas ribonucleoproteicas conocidas como **snRNP** compuestas de snRNA unidos a proteínas específicas. Los espliceosomas no están presentes dentro del núcleo en un estado prefabricado, sino que se ensamblan del mismo modo que se unen sus componentes snRNP al pre-mRNA. Una vez que la maquinaria del espliceosoma se ensambla, los snRNP llevan a cabo las reacciones que cortan los intrones de la transcripción y de nueva cuenta unen los extremos de los exones y los integran. Los intrones seccionados, que constituyen alrededor de 90% del pre-mRNA de los mamíferos, simplemente se degradan en el núcleo.

La comprensión de los pasos del procesamiento de RNA ha necesitado muchos estudios en extractos libres de células que pueden procesar con precisión el pre-mRNA in vitro. Algunos de los principales pasos en el ensamblado de un espliceosoma y la remoción de un intrón se muestran y describen con detalle en la figura 11-32. La remoción de un intrón requiere varias partículas de snRNP: los snRNP U1, U2, U5 y U4/U6, que contiene snRNA U4 y U6 unidos entre ellos. Además de estos snRNA, cada snRNP contiene una docena de proteínas o más. Una

FIGURA 11-31 La estructura y la vía de auto-*splicing* de los intrones del grupo II. *a*) Estructura bidimensional de un intrón del grupo II (se muestra en rojo). El intrón se pliega en seis dominios característicos. Los asteriscos indican los nucleótidos de adenosina que se abultan fuera del dominio VI y forman una estructura semejante a una soga, descrita en el texto. Los dos extremos del intrón llegan a estar muy cercanos entre sí, como lo indica la proximidad de los dos enlaces intrón-exón. *b*) Pasos en el auto-*splicing* de los intrones del grupo II. En el paso 1, el OH 2′ de una adenosina dentro del intrón (asterisco en el dominio VI de la parte *a*) realiza un ataque nucleofílico al sitio de *splicing* 5′, que corta el RNA y forma un enlace fosfodiéster 2′-5′ raro con el primer nucleótido del intrón. Esta estructura ramificada se describe como una soga. En el paso 2, el grupo OH 3′ libre del exón desplazado ataca al sitio de *splicing* 3′, el cual corta el RNA en el otro extremo del intrón. Como resultado de esta reacción, el intrón se libera en la forma de una soga y los extremos 3′ y 5′ de los dos exones flanqueadores se ligan (paso 3). Una vía similar se sigue en el *splicing* de intrones de los pre-mRNA, pero en lugar de suceder por auto-*splicing*, estos pasos requieren la ayuda de distintos factores adicionales.

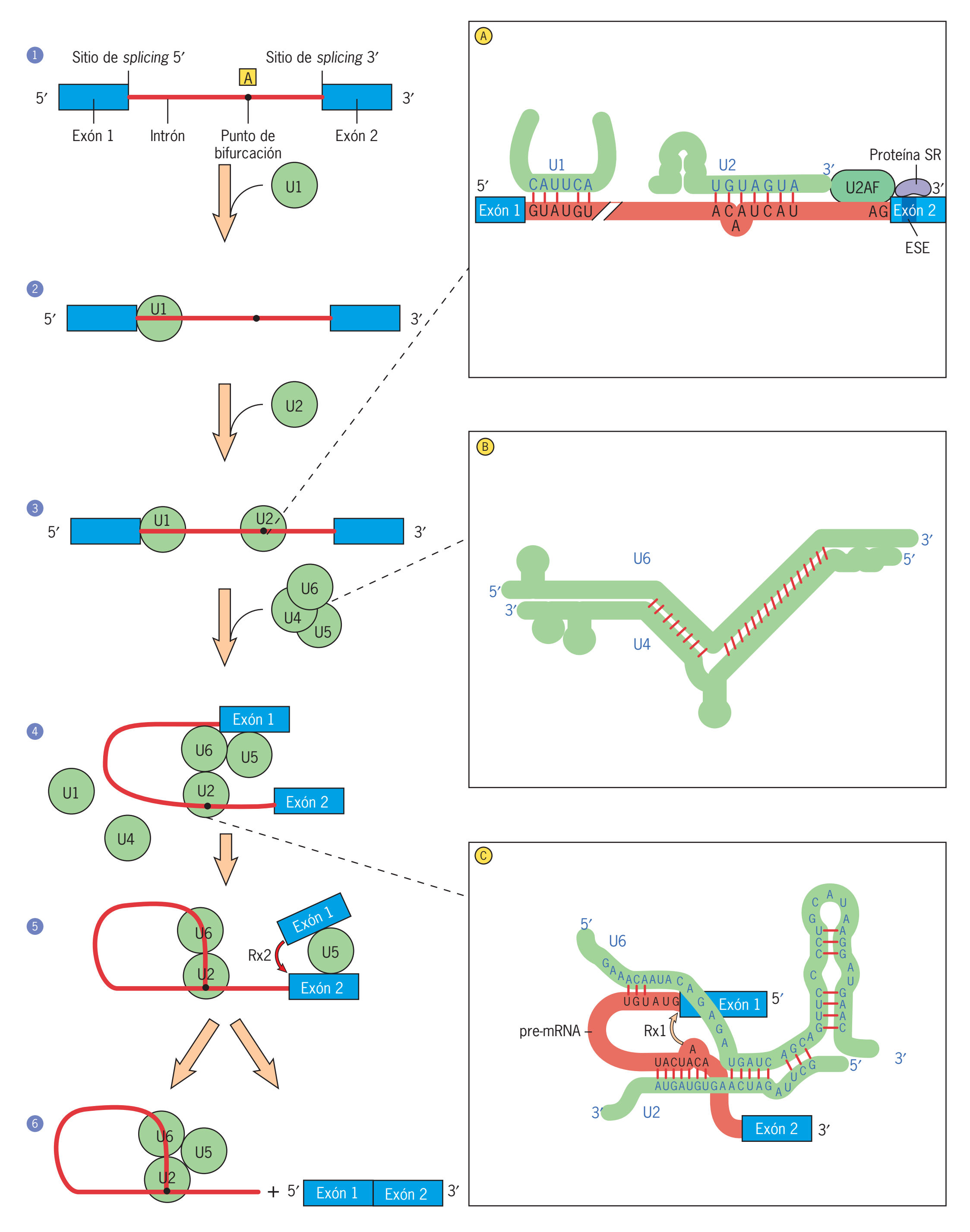


FIGURA 11-32 Modelo esquemático del ensamble de la maquinaria de *splicing* y algunos de los pasos que ocurren durante este proceso. El paso 1 muestra la porción del pre-mRNA que se somete a *splicing*. En el paso 2, el primero de los componentes del *splicing*, U1 snRNP, se ha unido al sitio 5′ del *splicing* del intrón. La secuencia nucleotídica del snRNA U1 es complementaria del sitio de *splicing* 5′ del pre-mRNA y hay evidencias que indican que el snRNP U1 se une de manera inicial al extremo 5′ del intrón por la formación de pares de bases específicas entre el sitio de *splicing* y el snRNA U1 (véase recuadro A). El snRNP U2 es el siguiente en entrar al complejo de *splicing* y se une al pre-mRNA (como se muestra en el recuadro A), lo cual ocasiona que un residuo de adenosina específico (resaltado) se exponga hacia afuera de la hélice (paso 3). Éste es el sitio que más tarde se convierte en un punto de bifurcación de la soga. Se piensa que al U2 lo recluta la proteína U2AF, que se une a la secuencia de polipirimidina cerca del sitio de *splicing* 3′. U2AF también interacciona con las proteínas SR que se unen a los aumentadores exónicos de *splicing* (ESE). Estas interacciones juegan una función importante en el reconocimiento de los extremos intrón/exón. El próximo paso es la unión de los snRNP U4/U6 y U5 al pre-mRNA con el desplazamiento de U1 (paso 4). El ensamble de un espliceosoma implica una serie de interacciones dinámicas entre el pre-mRNA y los snRNA específicos y entre los snRNA mismos. A medida que entran en el complejo con el pre-mRNA, los snRNA U4 y U6 se aparean de manera extensa el uno con el otro (recuadro B). El snRNA U4 se separa después del dúplex y las regiones de U6 que estaban apareadas con U4 se aparean con una porción de los snRNA U2 (recuadro C). Otra porción del snRNA U6 se halla en el sitio de *splicing* 5′ (recuadro C) y ha desplazado al snRNA U1 que antes estaba unido ahí (recuadro A). Al parecer, el U6 es una ribozima y el U4 un inhibidor de su actividad catalítica. Una vez que los snRNA U1 y U4 se han desplazado el snRNA U6 se encuentra en posición para catalizar las dos reacciones químicas requeridas para la remoción del intrón. La primera reacción (indicada por la flecha en el recuadro C) genera el corte del sitio de *splicing* 5′ y forma un exón 5′ libre y una soga del intrón 3′ del exón intermediario (paso 5). Se piensa que la porción 5′ libre del exón se coloca en el lugar por su relación con el snRNA U5 del espliceosoma, que también interactúa con el sitio de *splicing* 3′ (paso 5). A la primera reacción de corte en el sitio de *splicing* 5′ le sigue una segunda reacción de corte en el sitio de *splicing* 3′ para eliminar el intrón en forma de soga y de manera simultánea unir los extremos de los dos exones vecinos (paso 6). Después del *splicing*, los snRNP deben liberarse del pre-mRNA, reiniciarse las relaciones originales entre los snRNA y reensamblarse los snRNP en los sitios de otros intrones.

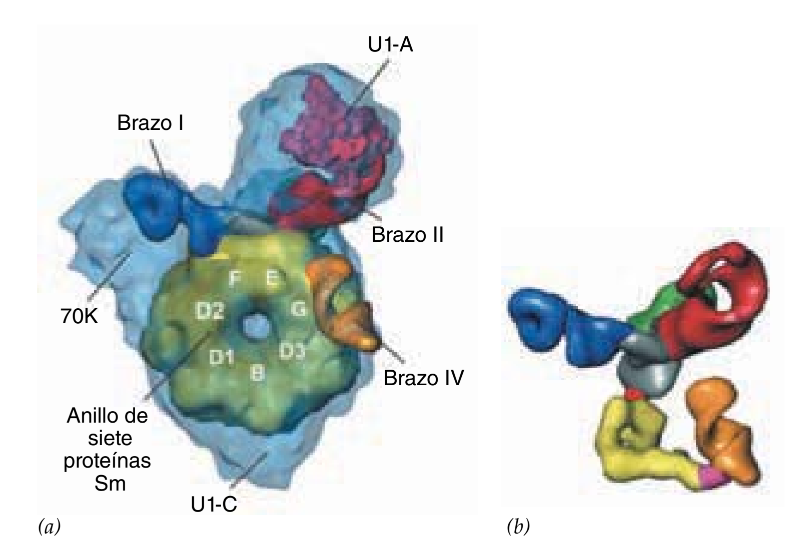


FIGURA 11-33 La estructura de un snRNP. *a*) Modelo de una partícula snRNP U1 basada en datos bioquímicos e información estructural obtenida a partir de microscopia crioelectrónica. En el núcleo de la partícula se halla un complejo proteico en forma de anillo compuesto de siete proteínas Sm diferentes y comunes en todos los snRNP U. Otras tres proteínas son únicas de los snRNP U1 (llamadas 70K, U1-A y U1-C). Los brazos I, II y IV son partes de los snRNA U1 de 165 bases. El snRNP se ensambla en el citoplasma y se importa al núcleo, donde realiza su función. *b*) Modelo de un snRNA U1 casi en la misma orientación que en *a*. (Reimpresa con autorización de Holger Stark et al., Nature 409:541, 2001; © 2001 Macmillan Magazines Limited.)

familia, las denominadas *proteínas Sm*, está presente en todos los snRNP. Las proteínas Sm se unen una con otra y con un sitio conservado de cada snRNA (excepto snRNA U6) para formar un núcleo del snRNP. La figura 11-33 muestra un modelo estructural del snRNP U1, con la localización de los snRNA, las proteínas Sm y otras proteínas dentro de la partícula indicada. Las proteínas Sm se identificaron primero debido a que son el blanco de anticuerpos generados en pacientes con una enfermedad autoinmunitaria llamada lupus eritematoso sistémico. Las otras proteínas del snRNP son únicas para cada partícula.

Los sucesos descritos en la figura 11-32 proveen excelentes ejemplos de las interacciones dinámicas y complejas que ocurren entre las moléculas de RNA. Los reordenamientos múltiples entre las moléculas de RNA que pueden tener lugar durante el ensamblaje de un espliceosoma están mediados con probabilidad por helicasas de RNA consumidoras de ATP presentes dentro de los snRNP. Las helicasas de RNA pueden desenredar la doble cadena de los RNA, tal y como se observa en el dúplex U4-U6 de la figura 11-32, recuadro B, el cual permite el desplazamiento de los RNA para unir nuevas regiones. Las helicasas de espliceosoma también desenrollan al parecer los RNA de proteínas unidas, incluida la proteína U2AF de la figura 11-32, recuadro A. Por lo menos ocho helicasas diferentes intervienen en el *splicing* del pre-mRNA en las levaduras.

Dos factores: a) que los pre-mRNA se procesan por las mismas reacciones químicas de auto-*splicing* en los intrones del grupo II, y b) que los snRNA necesarios para el *splicing* del pre-mRNA semejan partes de los intrones del grupo II (fig. 11-34), sugieren que los snRNA son los componentes activos catalíticos de los snRNP, no las proteínas. En otras palabras, se piensa que el espliceosoma es más bien una ribozima, una propuesta que ha recibido considerable apoyo desde el punto de vista experimental. Se cree que las proteínas tienen funciones complementarias: mantener la propia estructura tridimensional de los snRNA, controlar los cambios de la conformación del snRNA, transportar los mRNA procesados a la envoltura nuclear y seleccionar los sitios utilizados durante el procesamiento de un pre-mRNA específico. De los diferentes snRNA que participan en el *splicing* del RNA, el U6 cataliza por lo general ambos cortes en el pre-mRNA requeridos para la eliminación de intrones.

Como se ha mencionado con anterioridad, las secuencias situadas dentro de los exones, llamadas aumentadoras del *splicing* exónico (ESE), participan en el reconocimiento de exo-

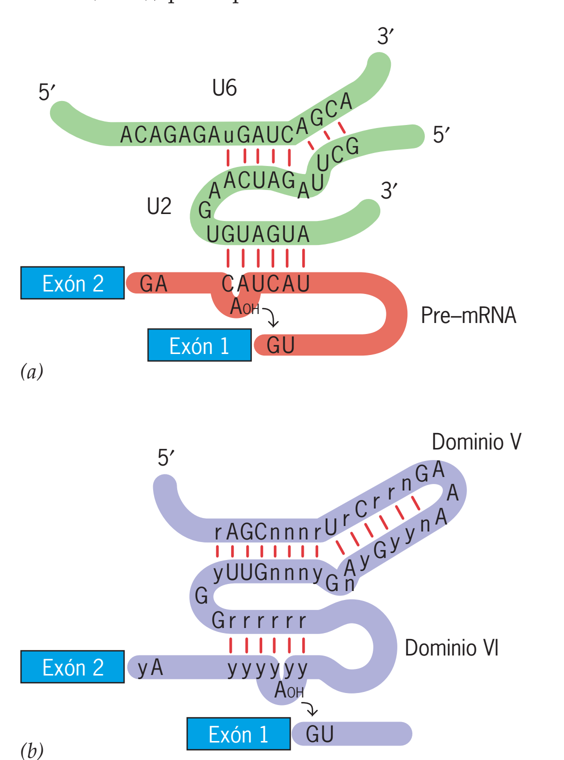


FIGURA 11-34 Similitudes estructurales propuestas entre las reacciones de *splicing* realizadas por el espliceosoma en los pre-mRNA y las reacciones de auto-*splicing* de los intrones del grupo II. *a*) Interacciones entre un intrón de una molécula de pre-mRNA (flanqueada por los exones 1 y 2) y dos snRNA (U2 y U6) que se requieren para el *splicing*. *b*) La estructura de un intrón del grupo II muestra un ordenamiento de las partes críticas que se alinean durante el auto-*splicing* (como se indica en la figura 11-31). La semejanza de las partes del intrón del grupo II con los RNA combinados en la parte *a* es evidente. Los residuos que no varían se muestran en letras mayúsculas; las purinas y las pirimidinas conservadas se expresan por r y y, respectivamente. Los residuos variables se muestran con una n. (Según A. M. Weiner, Cell 72:162, 1993; con autorización de Cell Press.)

nes por medio de la maquinaria del *splicing*. Las ESE sirven como sitios de unión para una familia de proteínas que unen RNA, conocidas como *proteínas SR* [llamadas así debido al gran número de dipéptidos de arginina (R)-serina (S)]. Al parecer, las proteínas SR interactúan en complejos que abarcan las uniones intrón/exón y ayudan a movilizar a los snRNP a los sitios de *splicing* (véase fig. 11-32, recuadro A). Las proteínas SR cargadas de manera positiva también se pueden unir por fuerza electrostática a los grupos fosfato de carga negativa que se agregan a la CTD de la polimerasa cuando la transcripción se inicia (fig. 11-20). Como resultado, el ensamble de la maquinaria de procesamiento en un intrón ocurre en conjunción con la síntesis del intrón por la polimerasa. Se piensa que la CTD recluta a una amplia variedad de factores de *splicing*. De hecho, se requiere la mayor parte de la maquinaria para el *splicing* del mRNA y su exportación al citoplasma con la polimerasa como parte de una gran "fábrica de mRNA" (fig. 11-35).

En virtud de que la mayoría de los genes contienen varios intrones, las reacciones de *splicing* mostradas en la figura 11-32 deben ocurrir de forma repetida sobre una misma transcripción primaria. La evidencia sugiere que los intrones se eliminan de acuerdo con un orden determinado y que se generan intermediarios de procesamiento específicos cuyos tamaños se extienden entre la transcripción primaria y el mRNA maduro. En la figura 11-36 se muestra un ejemplo de intermediarios formados durante el procesamiento nuclear del RNA mensajero ovomucoide en las células del oviducto de la gallina.

Implicaciones evolutivas de la rotura de genes y el *splicing* del RNA

El descubrimiento de la capacidad del RNA para catalizar reacciones químicas tuvo un enorme efecto sobre el concepto de la evolución biológica. Una de las preguntas fundamentales planteadas por los biólogos evolutivos desde el descubrimiento del DNA es la siguiente: ¿cuál fue el primer material genético, la proteína o el DNA? El dilema procede de las funciones al parecer no superpuestas de estos dos tipos de macromoléculas. Los ácidos nucleicos almacenan información, en tanto que las proteínas catalizan reacciones. Con el descubrimiento de las ribozimas a principios de la década de 1980 resultó evidente que el RNA podía hacer ambas cosas.

Estos hallazgos alimentaron la creencia de que el DNA y las proteínas no se hallaban en el estado inicial de la evolución de la vida. Durante este periodo, las moléculas de RNA ejecutaron una doble tarea: sirvieron como material genético y como catalizadores de las reacciones químicas, incluidas las necesarias para la replicación del RNA. En esta etapa, la vida podía des-

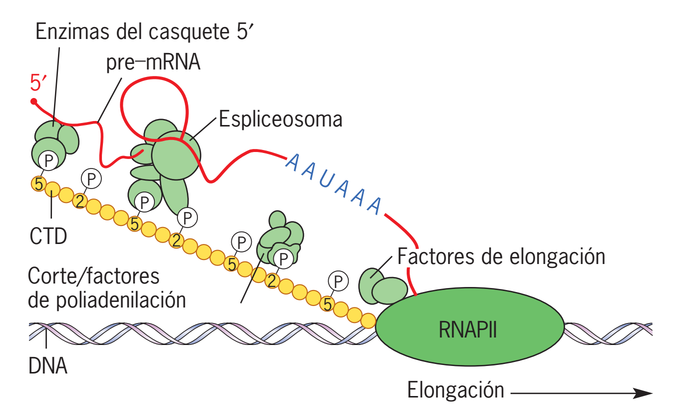


FIGURA 11-35 Representación esquemática de un mecanismo para la coordinación de la transcripción, casquete, poliadenilación y *splicing*. En este modelo simplificado, el dominio C-terminal (CTD) de la subunidad grande de la polimerasa de RNA (pág. 446) sirve como un andamiaje para la organización de los factores que intervienen en el procesamiento de los pre-mRNA, incluidos los que participan en el *casquete*, poliadenilación y remoción de intrones. Además de las proteínas representadas aquí, la polimerasa tal vez se relacione con un hospedador de factores transcripcionales y también con enzimas que metilan histonas. Las proteínas unidas a la polimerasa pueden depender en cualquier momento de los residuos de serina del CTD que se fosforilan. (SEGÚN E. J. STEINMETZ, CELL 89:493, 1997; CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS.)

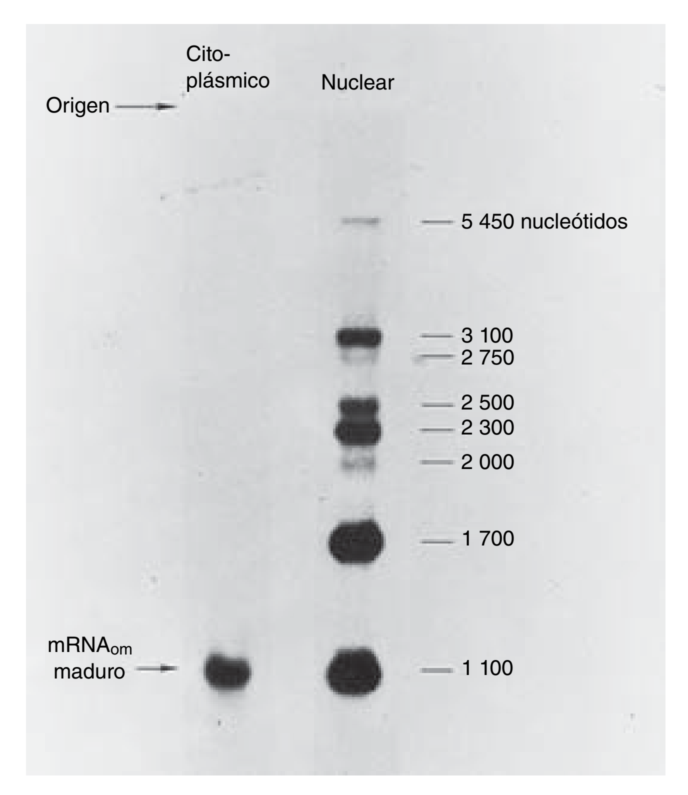


FIGURA 11-36 Procesamiento del pre-mRNA ovomucoide. La fotografía muestra una técnica conocida como Northern blot, en la cual el RNA extraído (en este caso del núcleo de células del oviducto de gallina) se fracciona por electroforesis en gel y se transfiere a un filtro membranal. El RNA inmovilizado en el filtro se incuba con un cDNA marcado con radiactividad (en este caso un cDNA elaborado a partir del mRNA ovomucoide) para producir bandas que identifiquen la posición de los RNA que contienen la secuencia complementaria. El mRNA maduro que codifica a la proteína ovomucoide posee una longitud de 1 100 nucleótidos y se muestra en la parte inferior del ensayo. Es evidente que el núcleo contiene varios RNA más largos que también tienen la secuencia nucleotídica del mRNA ovomucoide. El RNA más largo en el ensayo posee una longitud de 5 450 nucleótidos y corresponde al tamaño de la unidad de transcripción ovomucoide; se presume que este RNA es la transcripción primaria de la cual se deriva el mRNA. Otras bandas prominentes contienen RNA con longitudes de 3 100 nucleótidos (que corresponden a una transcripción que perdió los intrones 5 y 6), 2 300 nucleótidos (una transcripción que perdió los intrones 4, 5, 6 y 7) y 1 700 nucleótidos (una transcripción que perdió todos los intrones excepto el 3). (CORTESÍA DE BERT O'MALLEY.)

cribirse como "**un mundo de RNA**". Sólo en la última etapa de la evolución la proteína y el DNA adquirieron las funciones de almacenamiento de la información y catálisis, respectivamente; el RNA sólo conservó la función primaria de intermediario en el flujo de información genética. Muchos investigadores piensan que el *splicing* representa un ejemplo de un legado de un mundo antiguo de RNA.

Aunque la presencia de los intrones pudo añadir una carga adicional a las células debido a que debían eliminar estas secuencias interpuestas de sus transcripciones, los intrones tienen sus virtudes. Como se describe en el siguiente capítulo, el procesamiento del RNA es uno de los pasos sometidos a regulación celular en la vía para formar mRNA. Muchas transcripciones primarias pueden procesarse en dos o más vías, de modo que la secuencia que actúa como intrón en una vía se puede convertir en exón en una vía alterna. Como resultado de este proceso, denominado *splicing alternativo*, el mismo gen puede codificar más de un polipéptido.

También se descubrió que los intrones, más que los exones, codifican a los snoRNA requeridos para el procesamiento de rRNA (pág. 442). La mayoría de estos snoRNA se halla dentro de los intrones de genes que codifican a los polipéptidos que intervienen en el ensamble de ribosomas y su función. Cuando estos genes se transcriben y los intrones se eliminan de las transcripciones primarias, más que descartarlos, algunos de estos intrones se procesan en snoRNA. Se han descubierto diferentes genes en los cuales las funciones de los intrones y los exones son esencialmente contrarias. Estos genes se transcriben en los transcritos primarios cuyos intrones se procesan en snoRNA, en tanto que los exones se degradan sin dar lugar a un mRNA.

Se piensa que la presencia de intrones ha tenido un gran efecto en la evolución biológica. Cuando se examina la secuencia aminoacídica de una proteína, se encuentra a menudo que contiene secciones que son homólogas de diferentes partes de otras proteínas (véanse ejemplos en las figuras 2-36 y 7-22). Las proteínas de este tipo las codifican genes que son composiciones hechas con partes de otros genes. El movimiento de los "módulos" genéticos entre genes no relacionados (un proceso conocido como **intercambio exónico**) se facilita en gran medida por la presencia de intrones, que semejan elementos espaciadores inertes entre los exones. Las reconfiguraciones genéticas requieren la rotura de las moléculas de DNA, que puede ocurrir dentro de los intrones sin introducir mutaciones capaces de alterar al organismo. Con el tiempo, los exones pueden intercambiarse de forma independiente por diferentes mecanismos y ello posibilita un número casi infinito de combinaciones en la búsqueda de secuencias codificantes nuevas y útiles. Como resultado de este intercambio de exones, la evolución no necesita ocurrir sólo por la lenta acumulación de mutaciones puntuales, sino que debe avanzar mediante "saltos cuánticos" con proteínas nuevas que aparecen en una sola generación.

Creación de nuevas ribozimas en el laboratorio

En la mente de muchos biólogos, el principal punto de discusión respecto de la posibilidad de un mundo de RNA en el cual esta molécula actúe como un catalizador señala que hasta ahora sólo se han encontrado unas cuantas reacciones catalizadas por los RNA que están *de manera natural* en las células. Éstas incluyen el corte y ligamiento de los enlaces fosfodiéster requeridos para el *splicing* del RNA y la formación de enlaces peptídicos durante la síntesis de proteínas. ¿Acaso sólo estos tipos de reacciones son capaces de catalizar las moléculas de RNA o su espectro catalítico se ha restringido de modo notorio por la evolución a proteínas enzimáticas más eficientes? Diferentes grupos de investigadores exploran el *potencial* catalítico del RNA por medio de la creación de nuevas moléculas de RNA en el laboratorio. A pesar de que estos experimentos nunca probarán que tales moléculas de RNA existieron en los organismos antiguos, serán una prueba del *principio* según el cual dichas moléculas de RNA pudieron evolucionar a través de un proceso de selección natural.

En un método, los investigadores crean RNA catalíticos desde cero sin ningún diseño acerca de cómo podría estar construido el RNA. Los RNA se producen permitiendo que máquinas sintetizadoras de DNA automatizadas de DNA ensamblen DNA con secuencias nucleotídicas *aleatorias*. La transcripción de estos DNA crea una población de RNA cuyas secuencias nucleotídicas se determinan también de modo aleatorio. Tras obtener una población de RNA, los miembros individuales pueden seleccionarse de la población gracias a las propiedades particulares que poseen. Esta conducta se describe como "evolución dentro del tubo de ensayo".

En un grupo de estudios, los investigadores seleccionaron de manera inicial RNA que se unía a aminoácidos específicos y luego a una subpoblación que debía transferir un aminoácido específico al extremo 3′ de un tRNA blanco. Esta es la misma reacción básica que efectúan las sintetasas de aminoacil-tRNA, que son enzimas capaces de unir los aminoácidos a los tRNA requeridos para la síntesis proteica (pág. 469). Se ha conjeturado que los aminoácidos pudieron utilizarse de manera inicial como adjuntos (cofactores) para aumentar las reacciones catalíticas que llevan a cabo las ribozimas. Con el tiempo, es posible que las ribozimas evolucionaran y fueran capaces de unir aminoácidos específicos para formar pequeñas proteínas, más versátiles en la catálisis que sus RNA anteriores. Como se describe más adelante en este capítulo, los ribosomas (las máquinas de ribonucleoproteínas encargadas de la síntesis de proteínas) son en esencia ribozimas, las cuales proveen una base importante para este escenario evolutivo.

A medida que las proteínas realizaron gran parte del trabajo de la célula primitiva, el mundo del RNA se transformó de manera gradual en un "mundo de RNA y proteína". En un punto más tardío, es probable que el DNA remplazara al RNA como material genético e impulsara las formas de vida del presente "mundo de DNA-RNA-proteína". La evolución del DNA pudo necesitar sólo dos tipos de enzimas: una reductasa de ribonucleótido para convertir los ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos y una transcriptasa inversa para transcribir el RNA a DNA. El hecho de que la catálisis de RNA no parece intervenir en la síntesis de DNA o la transcripción apoya la idea de que el DNA fue el último miembro de la tríada DNA-RNA-proteína que apareció en escena.

En alguna parte del curso evolutivo, un código evolucionó y permitió al material genético codificar la secuencia de los aminoácidos para incorporarse en una proteína particular. La naturaleza de este código es el tema de la última sección de este capítulo.

REVISIÓN ?

1. ¿Qué significa el corte de genes?, ¿cómo fue descubierta la existencia del corte de genes?
2. ¿Cuál es la relación entre el hnRNA y los mRNA?, ¿cómo se descubrió esta interrelación?
3. ¿Cuáles son los pasos generales en el procesamiento de un pre-mRNA en un mRNA?, ¿cuál es la función de los snRNA y el espliceosoma?
4. ¿Cuál es el significado del término "mundo de RNA"?, ¿qué tipo de evidencia sugiere su existencia?
5. ¿Cuál es el significado de la frase "evolución en el tubo de ensayo" como se aplica a la actividad catalítica de las moléculas de RNA?

(a)

(b)

(c)

FIGURA 11-37 Interferencia de RNA. *a*) Las petunias normalmente son de color púrpura. Las flores de esta planta son blancas porque las células contienen un gen extra (un transgén) que codifica una enzima necesaria para la producción de color. El gen agregado ocasiona una interferencia de RNA que causa la destrucción específica de mRNA transcrito tanto desde el transgén como de los genes de la propia planta, lo cual hace que las flores sean básicamente despigmentadas. *b*) Un nematodo con un gen que codifica una proteína de fusión GFP (pág. 278) expresado de manera específica en la faringe del animal. *c*) Este gusano se desarrolló de un progenitor con el mismo genotipo que el mostrado en *b* cuyas gónadas se habían inyectado con una solución del dsRNA complementario del mRNA de la proteína bajo estudio. La ausencia de tinción refleja la destrucción del mRNA por un RNA de interferencia. (*A*, TOMADA DE DAVID BAULCOMBE, CURR. BIOL. 12: R82, 2002; CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS; *B*, *C*, COPYRIGHT © 2006 NEW ENGLAND BIOLABS; REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN.)

11.5 RNA NO CODIFICADORES PEQUEÑOS Y VÍAS DE SILENCIAMIENTO DE RNA

La idea de que en la regulación de la expresión génica intervienen directamente moléculas de RNA comenzó con una observación intrigante. Normalmente los pétalos de las petunias son de color púrpura claro. En 1990, dos grupos de investigadores informaron acerca de un intento de intensificar el color de las flores mediante la introducción de copias extra de un gen que codifica una enzima productora de pigmento. Para sorpresa de los investigadores, la presencia de los genes adicionales hizo que los pétalos perdieran su pigmentación en vez de intensificarla, como se esperaba (fig. 11-37*a*). Estudios posteriores indicaron que, bajo esas condiciones experimentales, tanto los genes agregados como sus contrapartes normales dentro del genoma se transcribían, pero los mRNA resultantes estaban un tanto degradados. Este fenómeno llegó a conocerse como *silenciamiento génico postranscripcional* (PTGS, del inglés *posttranscriptional gene silencing*).

No fue sino hasta 1998 cuando se comprendió la base molecular de esta forma de silenciamiento génico. En ese año, Andrew Fire del *Carnegie Institute* y Craig Mello de la *University of Massachusetts* realizaron un experimento con el nematodo *C. elegans*. Inyectaron a estos gusanos varios preparados distintos de RNA con la esperanza de detener la producción de una proteína específica. Uno de los preparados contenía RNA "con sentido", es decir, un RNA con la secuencia del mRNA que codificaba la proteína de interés; otro preparado contenía RNA "antisentido", esto es, un RNA con la secuencia complementaria a la del mRNA en cuestión, y un tercer preparado constaba de un RNA de doble cadena que contenía tanto la secuencia con sentido como la secuencia antisentido unidas entre sí. Ninguno de los RNA monocatenarios tuvo mucho efecto, pero el RNA de doble cadena fue muy eficaz para detener la producción de la proteína codificada. Fire y Mello describieron el fenómeno como **interferencia de RNA** (**iRNA**). Demostraron que los RNA de doble cadena (dsRNA) eran captados por las células, donde inducían una respuesta que llevaba a la destrucción selectiva de los mRNA con la misma secuencia que los dsRNA agregados. Digamos por ejemplo que se desea detener la producción de la enzima fosforilasa de glucógeno dentro de las células de un nematodo, de modo que sea posible determinar el efecto de esta deficiencia enzimática en el fenotipo del gusano. Notablemente, este resultado puede obtenerse con sólo colocar al gusano en una solución de dsRNA que tenga la misma secuencia que el mRNA blanco. Un experimento similar se muestra en la figura 11-37*b*, *c*. Este fenómeno es similar en el efecto, aunque muy diferente en el mecanismo, a la formación de los ratones genéticamente modificados que pierden un gen en particular que codifica una proteína específica.

El fenómeno de la interferencia de RNA mediada por dsRNA, un ejemplo del fenómeno más amplio de **silenciamiento de RNA**, ocurre extensamente en eucariotas. Se piensa que el iRNA evolucionó como un tipo de "sistema inmunitario genético" para proteger al organismo de la presencia de material genético extraño o no deseado. Para ser más específicos, es probable que el iRNA evolucionara como un mecanismo para bloquear la replicación de virus o suprimir el movimiento de los transposones dentro del genoma, debido a que estos dos procesos son potencialmente peligrosos y por lo general suponen

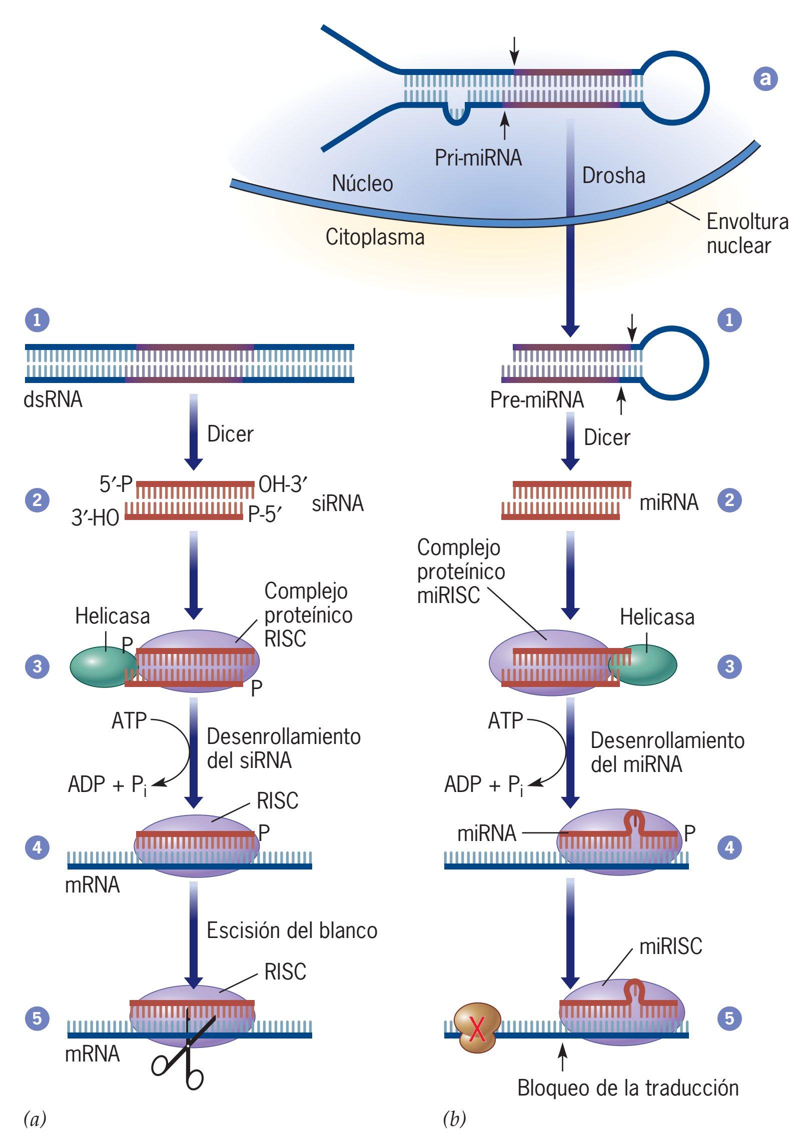


FIGURA 11-38 Formación y mecanismo de acción de los siRNA y miRNA. *a*) En el paso 1, la endonucleasa Dicer corta un RNA de doble cadena para formar un siRNA pequeño (21 a 23 nucleótidos), que tiene extremos salientes (paso 2). En el paso 3 el siRNA se relaciona con un complejo proteínico (RISC) y una helicasa que desenrolla las dos cadenas de RNA. En el paso 4 el siRNA monocatenario activo, vinculado con proteínas del complejo RISC, se une a un mRNA blanco que tiene una secuencia complementaria. En el paso 5 el mRNA se corta en sitios específicos y luego se degrada. *b*) Los microRNA se derivan de RNA monocatenarios precursores que contienen secuencias complementarias las cuales les permiten plegarse sobre sí mismos para formar un RNA de doble cadena con un asa en el extremo (paso a). Este seudo-dsRNA (o pri-miRNA) es escindido por un complejo proteínico que contiene una endonucleasa llamada Drosha para generar un pre-miRNA que tiene una saliente 3′ en un extremo. El pre-miRNA es exportado al citoplasma, donde la enzima Dicer lo corta en pequeños miRNA dúplex (paso 2) que tienen una saliente 3′ en ambos extremos. El RNA bicatenario se vincula con un complejo proteínico similar al de RISC (paso 3) y una helicasa que desenrolla el RNA y lo separa en cadenas sencillas. Uno de estos RNA monocatenarios (el miRNA maduro) se une entonces a una región complementaria en un mRNA (paso 4) e inhibe la traducción del mensaje (paso 5). A diferencia de los siRNA, los miRNA que inhiben la traducción casi nunca son por completo complementarios del mRNA blanco, de aquí el asa.

la formación de intermediarios de doble cadena de RNA. Las células pueden reconocer el dsRNA como una molécula “indeseable” dado que estas estructuras no se generan por las actividades genéticas normales de la célula.

¿Cómo puede el dsRNA dentro de una célula bloquear la formación de una proteína particular? La respuesta proviene de estudios del RNA de interferencia realizados en extractos libres de células. Los pasos incluidos en la vía del iRNA se muestran en la figura 11-38*a*. Los RNA de doble cadena que inician la respuesta se cortan primero en pequeños fragmentos (21 a 23 nucleótidos) de doble cadena, llamados **RNA pequeños de interferencia** (**siRNA**), por la acción de una ribonucleasa específica, denominada Dicer. Las enzimas de la clase a la cual pertenece Dicer generan RNA bicatenarios que tienen extremos 3′ salientes como se muestra en la figura 11-38*a*. Cada siRNA se desenrolla en sus cadenas separadas. Una de éstas (la cade-

na pasajera) es destruida y la otra se incorpora en un complejo proteínico conocido como complejo silenciador inducido por RNA, o *RISC* (del inglés *RNA-induced silencing complex*). El RISC constituye la maquinaria para que el diminuto siRNA monocatenario se una a un mRNA que tiene una secuencia complementaria. Una vez que se unen, el mRNA es escindido en un sitio específico por una ribonucleasa, conocida como "rebanadora", que es uno de los componentes del RISC. Así, el siRNA actúa como una guía que dirige el complejo hacia un RNA blanco complementario, el cual entonces es destruido por una proteína afín. Cada siRNA puede orquestar la destrucción de numerosas copias de mRNA, y de esa forma bloquea la síntesis de la proteína codificada.

Hasta el año 2001 pudo demostrarse que la interferencia por RNA ocurría en células diferentes a las de mamíferos. Cuando se agrega un dsRNA a las células de mamífero que crecen en cultivo, o se inyecta de forma directa en el organismo de un mamífero, más que detener la traducción de una proteína *específica* se inicia casi siempre una reacción *global* que inhibe la síntesis de proteína. Se piensa que este apagado global de la síntesis de proteínas (discutido en la sección 17.1) ha evolucionado en mamíferos como forma de proteger a las células de la infección vírica. Para obtener esta respuesta global a gran escala, los investigadores usaron los dsRNA pequeños y encontraron que el tratamiento de células de mamífero con dsRNA de 21 nucleótidos de longitud (es decir, equivalentes en tamaño al siRNA producido como intermediario durante la interferencia de RNA en otros organismos) no activó la inhibición *global* de la síntesis de proteínas. Sin embargo, estos dsRNA fueron capaces de iRNA, esto es, anularon la síntesis de proteínas específicas codificadas por un mRNA que tenía una secuencia nucleotídica complementaria. Las proteínas codificadas por otros mRNA no se afectaron. Esta técnica se ha convertido en una estrategia experimental importante para descubrir más acerca de la función de genes recién identificados. Es posible sólo bloquear la actividad del gen en cuestión (mediante dsRNA para destruir los mRNA transcritos) y buscar cualquier alteración celular que resulte de la deficiencia de la proteína codificada (véase fig. 18-50). Se han formado bibliotecas con miles de siRNA para su uso en experimentos encaminados a determinar las actividades de muchos genes en un solo estudio. La importancia clínica potencial de la iRNA se analiza en Perspectiva humana.

PERSPECTIVA HUMANA

Aplicaciones clínicas de la interferencia de RNA

Los científicos médicos buscan de manera constante "balas mágicas", compuestos terapéuticos que eliminen una enfermedad en particular de una manera muy específica sin efectos colaterales tóxicos. Hay que considerar dos tipos principales de enfermedades (infecciones víricas y tumoraciones) que son blanco para un nuevo tipo de "bala mágica" molecular. Los virus son capaces de destruir una célula infectada debido a que sintetizan RNA mensajeros que codifican a proteínas víricas que alteran las actividades celulares. La mayoría de las células que se transforman en cancerosas contiene mutaciones en ciertos genes (llamados oncogenes), que provocan que estas células produzcan mRNA mutantes, traducidos en versiones anormales de proteínas celulares. Considérese qué sucedería si un paciente con una de estas afecciones pudiera tratarse con un agente que destruyera o inhibiera los mRNA específicos transcritos por el genoma vírico o los genes mutantes del cáncer, al mismo tiempo que se ignoraran otros mRNA de la célula. En los años recientes se han desarrollado diferentes conductas que tienen ese objetivo en su diseño; la más reciente toma ventaja del fenómeno de la interferencia de RNA.

Como ya se mencionó, las células de mamífero pueden someterse a iRNA (un proceso que lleva a la degradación de un mRNA específico) tras introducir en las células un siRNA de doble cadena en el cual una de las cadenas es complementaria del mRNA blanco. Cuando las células se incuban con siRNA sintético de 21 a 23 nucleótidos, las células captan estas moléculas, las incorporan en un mRNA y son el blanco de un complejo de corte formado por ribonucleoproteínas (como se muestra en la figura 11-38*a*), el cual ataca al mRNA complementario. De manera alternativa, el iRNA puede inducirse en las células de mamífero manipuladas por medios genéticos para portar un gen con repetidos invertidos. Cuando el gen se transcribe, el producto de RNA se pliega sobre sí mismo para crear un precursor de siRNA en forma de tallo y burbuja (p. ej., de doble cadena), similar al que se muestra en la figura 11-38*b*, que se procesa dentro de un siRNA activo. Una amplia variedad de células en cultivo portadoras de genes causantes de enfermedades se ha sometido a este tipo de tecnología de iRNA y los resultados son muy promisorios. Como se ha advertido ya, las células cancerosas contienen casi siempre uno o más genes mutados que codifican proteínas anormales productoras del fenotipo tumoral. Un ejemplo es cierta clase de leucemia, secundaria a un gen conocido como *BCR-ABL* que se forma por la fusión de dos genes normales. Un siRNA dirigido contra el mRNA producido por los genes de fusión *BCR-ABL* ha sido capaz de convertir las células en un fenotipo normal en cultivo. De manera similar, un siRNA contra un gen portador de un CAG expandido semejante al que ocasiona la enfermedad de Huntington (pág. 405) ha probado ser capaz de bloquear la producción de la proteína anormal. La mayoría de los estudios que prueban el valor terapéutico del siRNA se ha enfocado en las células infectadas por virus. La administración de siRNA complementarios a secuencias víricas de gripe, SARS o hepatitis ha prevenido o eliminado infecciones por estos virus en animales de laboratorio.

En el caso del sida existe la esperanza de que las cepas celulares puedan aislarse de un paciente, transfectarse con un vector que porte el siRNA y sea capaz de tomar un mRNA vírico como blanco y entonces retransfundirlas al individuo. Estas células tienen el potencial de generar el siRNA más o menos de manera continua y hacer que la célula y sus descendientes se tornen resistentes a la destrucción del virus. Sin embargo, existen ciertos obstáculos para el uso de la iRNA en el tratamiento de las infecciones víricas. La principal característica de la iRNA es su extraordinaria especificidad de secuencia, que puede

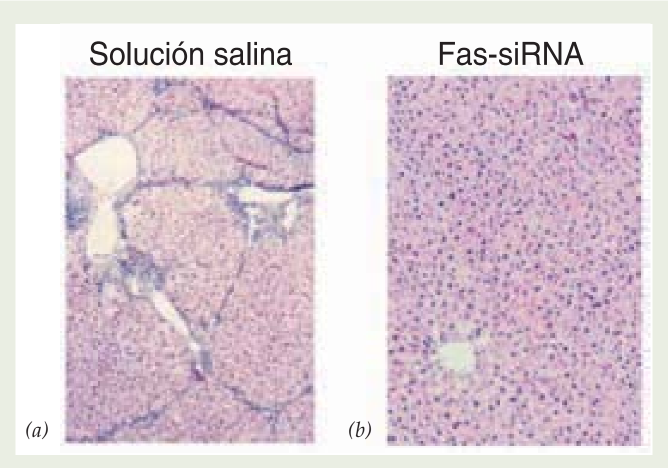


FIGURA 1 RNA de interferencia como medida terapéutica. *a*) Micrografía de luz de una sección teñida de un hígado de ratón que muestra los efectos de la hepatitis fulminante. La fibrosis ha invadido el órgano. *b*) Sección comparable de un ratón tratado de forma idéntica al observado en *a*, con la excepción de que el animal recibió inyección de siRNA cuyo blanco era el mRNA de *Fas*. La histología se observa normal. (Tomada de E. Song et al., Nature Med. 9:349, 2003. Cortesía de Judy Lieberman; © 2003 Macmillan Magazines Ltd.)

ser una virtud o un problema. En fecha reciente la iRNA ha probado ser inefectiva contra virus debido a que estos patógenos tienden a mutar con rapidez. Las mutaciones inducen cambios en la secuencia del genoma y propician la producción de mRNA no complementarios del siRNA terapéutico.

Como en otros tipos de terapias génicas, un gran obstáculo para utilizar la iRNA en el tratamiento de la enfermedad o la infección es la dificultad de liberar siRNA (o los vectores que codifican a éstos) para los tejidos afectados dentro del cuerpo. El primer intento importante de liberar el siRNA en un órgano dentro del cuerpo (en este caso el hígado de un ratón) fue exitosa de manera extraordinaria (fig. 1). La hepatitis fulminante es una afección inflamatoria que lleva a la insuficiencia del hígado en las personas que sufren diferentes enfermedades, entre ellas la infección por virus de la hepatitis. La hepatitis fulminante puede inducirse en ratones por el tratamiento con distintos agentes tóxicos. Estudios en estos ratones indican que la muerte de las células hepáticas la activa un receptor de superficie celular conocido como Fas. Los ratones sometidos a inyección intravenosa del siRNA, que tiene como blanco al mRNA de *Fas* y lo destruye, se tornan relativamente resistentes al desarrollo de la hepatitis fulminante, aun si el siRNA se libera después de la administración del agente tóxico. Esta observación sugiere que la progresión de la enfermedad puede detenerse incluso después de iniciado el daño hepático. Una de las ventajas de la liberación del siRNA a través de la corriente sanguínea (al contrario de la incorporación como parte de un vector de DNA) es que el efecto de la adición de RNA es transitorio y sólo perdura un par de semanas. En este caso particular esto es importante debido a que la deficiencia permanente de Fas precipita graves complicaciones de la función inmunitaria.

Se han iniciado pequeños ensayos clínicos de siRNA, pero aún no son evidentes los resultados. Las primeras aplicaciones terapéuticas de iRNA implican siRNA que pueden administrarse localmente, sin la necesidad de introducir los agentes en el torrente sanguíneo. Por ejemplo, varios pacientes que sufren degeneración macular, una enfermedad que produce degeneración de la retina, se han tratado con siRNA inyectados directamente en el globo ocular. Los siRNA están dirigidos contra un factor de crecimiento que estimula el desarrollo de vasos sanguíneos perjudiciales. Se espera que sea posible tratar enfermedades respiratorias con la administración de siRNA antivíricos mediante aerosol nasal. Este método ha sido eficaz para prevenir infecciones en animales de laboratorio. De manera similar, la transmisión de herpes genital en ratones puede evitarse en gran medida con la aplicación vaginal de siRNA dirigidos contra genes del VHS-2. Quizás el más significativo sea un estudio reciente dirigido contra la apolipoproteína B, la proteína implicada en la producción del llamado "colesterol malo" (pág. 315). Una sola inyección de liposomas que contenían el siRNA contra el mRNA *APOB* redujo significativamente las concentraciones séricas de colesterol y LDL en monos de laboratorio, sin efectos secundarios evidentes. Estos tipos de estudios son sólo los pasos iniciales en un largo camino de investigación, pero contienen la promesa de que un día la interferencia de RNA podrá usarse como una valiosa estrategia terapéutica.

MicroRNA: una red recién descubierta para la regulación génica

Hacia 1993 se sabía que los embriones de *C. elegans* que carecían del gen *lin-4* eran incapaces de pasar a la última etapa larvaria. En ese año Victor Ambros, Gary Ruvkun y sus colegas de la *Harvard University* informaron que el gen *lin-4* codifica un RNA pequeño que es complementario a algunos segmentos en la región 3′ no traducida de un mRNA específico que codifica la proteína LIN-14. Propusieron que, durante el desarrollo larvario, el RNA pequeño se une al mRNA complementario y bloquea la traducción del mensaje, lo cual activa una transición a la siguiente etapa del desarrollo. Los mutantes incapaces de producir el pequeño RNA *lin-4* poseen una concentración anormalmente alta de la proteína LIN-14 y no pueden experimentar de manera normal la transición a etapas larvarias posteriores. Éste fue el primer ejemplo claro de silenciamiento de RNA en la expresión génica, pero pasaron varios años antes de que se valorara la importancia generalizada de estos descubrimientos. En el año 2000 se encontró que uno de estos RNA pequeños del gusano (especies de 21 nucleótidos llamados *let-7*) posee un elevado grado de conservación a través de la evolución. Por ejemplo, los seres humanos codifican varios RNA que son idénticos o muy parecidos a los *let-7*. Tal observación motivó un interés explosivo por estos RNA.

En años recientes se evidenció que las plantas y los animales producen cientos de pequeños RNA llamados **micro-RNA** (**miRNA**) que, en virtud de su tamaño pequeño, habían pasado inadvertidos por muchas décadas. Igual que se descubrió originalmente en nematodos, los miRNA específicos como *lin-4* y *let-7* se sintetizan sólo en ciertos periodos durante el desarrollo, o en algunos tejidos de una planta o animal, y se piensa que tienen una función reguladora. En la figura 11-39 se muestra un ejemplo de expresión selectiva de miRNA específicos durante

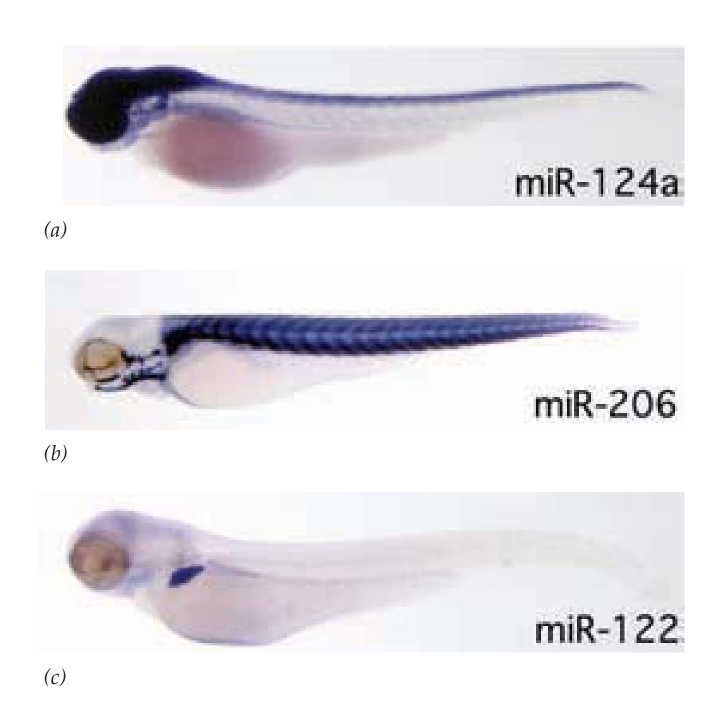


FIGURA 11-39 Los microRNA se sintetizan en tejidos específicos durante el desarrollo embrionario. Estas micrografías de embriones de peces cebra muestran la expresión específica de tres nRNA diferentes cuya localización es indicada por la tinción azul. *miR-124a* se expresa específicamente en el sistema nervioso *a*, *miR-206* en el músculo esquelético *b* y *miR-122* en el hígado *c*. (Tomada de Erno Wienholds, Wigard Kloosterman, et al., Science 309:311, 2005, cortesía de Ronald H. A. Plasterk; © copyright 2005, American Association for the Advancement of Science.)

el desarrollo del pez cebra. El tamaño de los miRNA, que oscila entre 20 y 23 nucleótidos de longitud, los coloca en el mismo intervalo de tamaño de los siRNA implicados en la iRNA. Esta observación es más que una coincidencia; los miRNA son producidos por una maquinaria de procesamiento similar a la que forma siRNA. Podría considerarse que miRNA y siRNA son "primos", ya que ambos actúan silenciando la expresión de mRNA citoplásmicos. Sin embargo, existen importantes diferencias, suponiendo que nuestra comprensión actual de los dos tipos de RNA es correcta. Un siRNA proviene del producto bicatenario de un virus o elemento transponible (o de un dsRNA proporcionado por un investigador) y se dirige a las mismas transcripciones de las cuales surgió. En cambio, un miRNA es codificado por un segmento ordinario del genoma y se dirige a un mRNA específico como parte de un programa celular normal. La mayoría de los microRNA son codificados por genes individuales (o grupos de genes), aunque algunos provienen de intrones de genes que codifican proteínas. Enseguida se consideran algunas diferencias evidentes en su modo de acción.

En la figura 11-38*b* se muestra la vía para la síntesis de un miRNA. Éste es sintetizado por polimerasa de RNA II como una transcripción primaria (o *pri-miRNA*) con un casquete 5′ y una cola poli(A). Esta transcripción primaria es escindida dentro del núcleo en un precursor bicatenario de plegamiento hacia atrás más pequeño (o *pre-miRNA*) mostrado en el paso 1 de la figura 11-38*b*. El pre-miRNA es exportado al citoplasma, donde da origen al miRNA bicatenario pequeño. El miRNA es extraído del pre-miRNA por Dicer, la misma ribonucleasa encargada de la formación de siRNA. Como en el caso de estos últimos, el miRNA bicatenario se desenrolla y una de las cadenas individuales se incorpora en un complejo RISC como se muestra en la figura 11-38*b*.

Un miRNA típico es parcialmente complementario a una porción del mRNA blanco (como en la figura 11-38*b*) y actúa como un inhibidor traduccional, igual que los descubiertos originalmente en nematodos. Sin embargo, algunos miRNA, en particular los hallados en plantas, dirigen la escisión del RNA unido en vez de inhibir su traducción. Los microRNA que dirigen la escisión de mRNA tienden a ser completamente complementarios a su mRNA blanco. Una multitud de estudios ha enfocado la atención en un espectro mucho más amplio de funciones reguladoras de los miRNA, incluidas la supresión de la transcripción de genes y la inducción de reordenamientos genómicos.

Uno de los retos en el estudio de los miRNA es la dificultad para identificar genes que codifican estas diminutas transcripciones. De hecho, la mayoría de los posibles genes de miRNA se identifican inicialmente a partir de análisis por computadora de secuencias de DNA genómico. Estimaciones recientes sugieren que el ser humano podría codificar hasta mil especies distintas de miRNA. Alrededor de un tercio de los RNA mensajeros del ser humano contienen secuencias que son complementarias a probables miRNA, lo cual da un indicio del grado en que estos RNA reguladores pequeños podrían estar implicados en el control de la expresión génica en organismos superiores. Además, muchos mRNA contienen secuencias que son complementarias a varios miRNA potenciales, lo cual sugiere que los miRNA podrían actuar en diversas combinaciones para la "sintonía fina" del nivel de expresión génica. Estas predicciones son apoyadas por experimentos en que se fuerza a las células a captar y expresar genes de miRNA específicos. Bajo estas condiciones, grandes cantidades de mRNA en las células manipuladas por ingeniería genética son afectados negativamente. Cuando en estas células se introducen diferentes genes de miRNA, distintos grupos de mRNA se regulan a la baja, lo cual indica que el efecto es específico de la secuencia.

Se ha propuesto que los microRNA participan en muchos procesos, incluida la formación de patrones en el sistema nervioso, el control de la proliferación y la muerte celular, la diferenciación de diversos tipos celulares y el desarrollo de hojas y flores en plantas. En la sección 16.3 se exploran las funciones de los miRNA en el desarrollo del cáncer. Se sabe que los miRNA son necesarios para el desarrollo temprano de los mamíferos, porque los embriones de ratón que carecen de proteínas procesadoras de miRNA, como Dicer, mueren en etapas embrionarias tempranas. La disección de las funciones de miRNA individuales durante el desarrollo y la homeostasis hística de los mamíferos promete ser un campo central de investigación en la siguiente década.

Otros RNA no codificadores A medida que el campo de la biología celular y molecular ha madurado, se ha reconocido de modo gradual la notable diversidad funcional y estructural de las moléculas de RNA. En los últimos decenios se han descubierto

varios tipos nuevos de RNA, como se describió en las páginas previas. Pero nada preparó a los investigadores para la cascada de descubrimientos recientes, que sugieren que más de 50% del genoma murino o humano se transcribe normalmente, mucho más de lo que habría podido esperarse con base en el número de secuencias de DNA significativas que se piensa están presentes. De hecho, la mayoría de las secuencias incluidas entre este DNA transcrito suelen considerarse "basura", inclusive grandes cantidades de elementos transponibles que constituyen una fracción considerable de los genomas de mamífero (pág. 414). Algunos estudios hacen surgir la interrogante de si existe alguna diferencia básica entre un gen y una región intergénica; informan que la transcripción puede comenzar en todo tipo de sitios inesperados del genoma o que la transcripción puede avanzar continuamente de un gen al siguiente. Otros estudios revelan que las células a menudo transcriben ambas cadenas de un elemento de DNA, produciendo tanto *RNA con sentido* como *RNA antisentido*. Algunos de estos RNA antisentido pueden estar implicados en procesos de silenciamiento génico como se ilustra en la figura 12-17, pero al parecer la transcripción de RNA antisentido está más difundida de lo que podría explicar el conocimiento actual. Entonces, ¿por qué una célula transcribe estos tipos de secuencias de DNA? Se desconoce la respuesta a esta interrogante básica. Según un punto de vista, gran parte de esta transcripción es simplemente el "ruido de fondo" que acompaña al complejo proceso de la expresión génica. Conforme a otro punto de vista opuesto, gran parte del RNA no codificador (*ncRNA*) que se produce participa en diversas actividades reguladoras que todavía no se identifican. Independientemente de la explicación real, un punto es claro: hay mucho que no se comprende acerca del cometido de los RNA en las células eucarióticas.

REVISIÓN ?

1. ¿Qué son los siRNA y los miRNA?, ¿cómo se forma cada uno en la célula?, ¿cuáles son sus funciones presumibles?

11.6 CODIFICACIÓN DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA

Una vez que la estructura del DNA se reveló en 1953, resultó evidente que la secuencia de nucleótidos en el DNA de un gen especificaba la secuencia aminoacídica en un polipéptido. Parecía improbable que el DNA sirviera como un molde físico directo para el ensamble de una proteína. De hecho, se asumió que la información almacenada en la secuencia nucleotídica estaba presente en algún tipo de **código genético**. Con el descubrimiento del RNA mensajero como intermediario en el flujo de información del DNA a una proteína, la atención se enfocó en la manera en la cual una secuencia escrita en un ribonucleótido "alfabeto" podía codificar a una secuencia en un "alfabeto" integrado por aminoácidos.

Las propiedades del código genético

El físico George Gamow presentó uno de los primeros modelos del código genético cuando propuso que tres nucleótidos secuenciales codificaban cada aminoácido en un polipéptido. En otros términos, las palabras del código, o **codones**, para los aminoácidos eran tripletes de nucleótidos. Gamow llegó a esta conclusión con un poco de lógica. Él razonó que al menos se *requerían* tres nucleótidos para cada codón único. Considérese el número de palabras que puede articularse con un alfabeto que contiene cuatro letras correspondientes a las cuatro bases posibles que pueden estar presentes en un sitio en particular en el DNA (o mRNA). Hay cuatro posibles palabras de una letra, 16 (4^2) posibles palabras de dos letras y 64 (4^3) palabras posibles de tres letras. Debido a que existen 20 diferentes aminoácidos (palabras) que deben codificarse, los codones deben contener al menos tres nucleótidos sucesivos (letras). Francis Crick, Sydney Brenner y sus colegas de la *Cambridge University* verificaron con rapidez la naturaleza de los tripletes del código en diferentes experimentos genéticos.[6]

Además de proponer que el código era un triplete, Gamow sugirió que estaba *superpuesto*. Aunque esta suposición era incorrecta, propició una importante pregunta concerniente al código genético. Considérese la siguiente secuencia de nucleótidos:

—AGCAUCGCAUCGA—

Si el código estuviera superpuesto, entonces el ribosoma debería mover a lo largo del mRNA un nucleótido a la vez y reconocer un nuevo codón con cada movimiento. En la secuencia precedente, AGC debe codificar un aminoácido, GCA el próximo aminoácido, CAU el próximo y así en adelante. En cambio, si el código *no estuviera superpuesto*, cada nucleótido a lo largo del mRNA debería ser parte de un codón, y sólo de uno. En la secuencia precedente, AGC, AUC y GCA deberían codificar a aminoácidos sucesivos.

Una conclusión de la naturaleza superpuesta o no del código genético se infirió a partir de estudios de proteínas mutantes, como la hemoglobina mutante causante de la anemia de células falciformes. En esta anormalidad, como en otros casos estudiados, se encontró que la proteína mutante contenía una sustitución de un solo aminoácido. Si el código está superpuesto, un cambio de un par de bases en el DNA debería afectar a tres codones consecutivos (fig. 11-40) y, de esta forma, tres aminoácidos consecutivos en el polipéptido correspondiente. Sin embargo, si el código no está superpuesto y cada nucleótido es parte sólo de un codón, sería esperable el remplazo de un solo aminoácido. Este y otros datos indicaron que el código no está superpuesto.

Debido a que un código basado en tripletes puede codificar a 64 diferentes aminoácidos, y a que en realidad existen sólo 20 aminoácidos para codificarse, surgió la pregunta sobre la

[6] Quien desee leer un breve artículo que expresa con entusiasmo la fuerza inductiva y elegancia de los estudios seminales en genética molecular, puede encontrar estos experimentos en el código genético en la revista *Nature* 192:1227, 1961.

Secuencia de bases	Codones	
Secuencia original . . . AGCATCG . . .	Código superpuesto . . ., AGC, GCA, CAT, ATC, TCG, . . .	Código no superpuesto . . ., AGC, ATC, . . .
Secuencia después de la sustitución de una sola base . . . AGAATCG . . .	Código superpuesto . . ., AGA, GAA, AAT, ATC, TCG, . . .	Código no superpuesto . . ., AGA, ATC, . . .

FIGURA 11-40 Diferencias entre un código genético superpuesto y uno no superpuesto. El efecto en el contenido de la información de un mRNA por una sola sustitución de bases depende de si el código está superpuesto o no. Los codones afectados están subrayados en rojo.

función de los 44 tripletes adicionales. Si cualesquiera o todos los otros 44 tripletes codifican aminoácidos, entonces más de un codón codifica a algunos de los aminoácidos. Un código de este tipo se dice que es *degenerado*. Como se descubrió, el código es muy degenerado, en casi todos los 64 codones posibles que codifican a aminoácidos. Se trata de los que no tienen una función especial de "puntuación" (tres de los 64), se reconocen por el ribosoma como codones de terminación y detienen la lectura del mensaje.

Francis Crick predijo de manera original la degeneración del código en una teoría al considerar el gran espectro de la composición de bases entre DNA de varias bacterias. Por ejemplo, se encontró que el contenido de G + C puede tener los límites de 20 a 74% del genoma, aunque la composición de aminoácidos de las proteínas de estos organismos mostró poca variación. Esto sugiere que los mismos aminoácidos los codificaron diferentes secuencias de bases, lo cual llevó a suponer que el código era degenerado.

La identificación de los codones En 1961 ya se conocían las propiedades generales del código, pero aún no se descubría alguna codificación específica asignada a los tripletes. En aquel tiempo, casi todos los genetistas pensaban que debían transcurrir cinco a 10 años antes de descifrar todo el código. Pero Marshall Nirenberg y Heinrich Matthaei desarrollaron una técnica para sintetizar sus propios mensajes genéticos artificiales y luego determinar qué tipo de proteína codificaban. El primer mensaje sometido a prueba fue un polirribonucleótido compuesto exclusivamente de uridina; el mensaje se denominó *poly(U)*. Cuando se añadió poly(U) al tubo de ensayo que contenía un extracto bacteriano con los 20 aminoácidos y los materiales necesarios para las síntesis de proteínas (ribosomas y varios factores solubles), el sistema siguió las instrucciones del mensajero artificial y elaboró un polipéptido. Al analizar el polipéptido ensamblado se observó que era una polifenilalanina, un polímero del aminoácido fenilalanina. Así Nirenberg y Matthaei habían demostrado que el codón UUU codificaba a la fenilalanina.

En los siguientes cuatro años, varios laboratorios se unieron en la búsqueda y se elaboraron mRNA sintéticos para probar las codificaciones de aminoácidos de los 64 codones posibles. El resultado fue la carta decodificadora universal para el código genético mostrada en la figura 11-41. La carta lista la secuencia nucleotídica para cada uno de los 64 posibles codones en un mRNA. Las instrucciones para leer la carta se encuentran en el pie de la figura.

Las asignaciones de los codones suministradas en la figura 11-41 son "en esencia" universales, esto es, están presentes en todos los organismos vivos. Las primeras excepciones a la universalidad del código genético se identificaron en los codones de los mRNA mitocondriales. Por ejemplo, en la mitocondria humana, UGA se lee como triptófano más que codón de detención, AUA como metionina más que isoleucina y AGA y AGG como codones de detención más que arginina. En fecha reciente se han hallado excepciones en los codones del DNA nuclear de los protistas y hongos. Con tales discrepancias, las similitudes entre los códigos genéticos son más importantes que sus diferencias y es evidente que las derivaciones menores han evolucionado como cambios secundarios del código genético estándar mostrado en la figura 11-41. En otras palabras, todos los organismos presentes en la Tierra muestran hoy día un origen evolutivo común.

El examen de la carta de codones de la figura 11-41 indica que la asignación de los aminoácidos no es aleatoria. Si se revisan las cajas de codones para un aminoácido específico, se advierte que tienden a agruparse dentro una porción particular de la carta. La formación de grupos refleja la similitud en los codones que codifican al mismo aminoácido. Como resultado de esta similitud en la secuencia de codones, las mutaciones espontáneas que causan cambios de una sola base en un gen no generan a menudo un cambio en la secuencia aminoacídica de la proteína correspondiente. Un cambio en la secuencia de nucleótidos que no afecta la secuencia de aminoácidos se denomina *sinónimo*, mientras que un cambio que causa una sustitución de aminoácidos es *no sinónimo*. En virtud de que los cambios sinónimos no suelen alterar el fenotipo de un organismo, no sufren selección natural positiva ni negativa. Este no es el caso para los cambios no sinónimos, que es probable que alteren el fenotipo de un organismo y están sujetos a selección natural. Ahora que se han secuenciado los genomas de organismos relacionados, como chimpancé y ser humano, es posible observar directamente las secuencias de genes homólogos y ver cuántos cambios son sinónimos o no sinónimos. Tal vez los genes que poseen un exceso de sustituciones no sinónimas en sus regiones codificadoras hayan sido influidos por selección natural (véase la nota al pie de la página 416).

Primera letra	U	C	A	G	Tercera letra
U	Fenilalanina	Serina	Tirosina	Cisteína	U
U	Fenilalanina	Serina	Tirosina	Cisteína	C
U	Leucina	Serina	Codón de terminación	Codón de terminación	A
U	Leucina	Serina	Codón de terminación	Triptófano	G
C	Leucina	Prolina	Histidina	Arginina	U
C	Leucina	Prolina	Histidina	Arginina	C
C	Leucina	Prolina	Glutamina	Arginina	A
C	Leucina	Prolina	Glutamina	Arginina	G
A	Isoleucina	Treonina	Asparagina	Serina	U
A	Isoleucina	Treonina	Asparagina	Serina	C
A	Isoleucina	Treonina	Lisina	Arginina	A
A	(inicio) Metionina	Treonina	Lisina	Arginina	G
G	Valina	Alanina	Ácido aspártico	Glicina	U
G	Valina	Alanina	Ácido aspártico	Glicina	C
G	Valina	Alanina	Ácido glutámico	Glicina	A
G	Valina	Alanina	Ácido glutámico	Glicina	G

Segunda letra

Ejemplos de tRNA

Codón UGC — cis — ACG

Codón CAC — his — GUG

Codón GGA — gli — CCU

FIGURA 11-41 El código genético. Esta carta universal de codificación lista cada uno de los 64 codones de mRNA posibles y el aminoácido correspondiente especificado por ese codón. Para usar la carta y traducir el codón UGC, por ejemplo, se debe encontrar la primera letra (U) en la fila indicada a la izquierda. Se sigue la fila de la derecha hasta encontrar la segunda letra (G) señalada en la parte superior; después se encuentra el aminoácido que coincide con la tercera letra (C) en la fila a la derecha. UGC codifica la inserción de cisteína. Cada aminoácido (excepto dos) posee dos o más codones que ordenan su inserción, lo cual hace al código genético degenerado. Un aminoácido particular tiende a ser codificado por codones relacionados. Esta característica reduce la probabilidad de que las sustituciones de bases resulten en cambios de la secuencia aminoacídica de una proteína. Los aminoácidos con propiedades similares también tienden a estar agrupados. Los aminoácidos con cadenas laterales ácidas se muestran en rojo, aquellos con cadenas laterales básicas en azul, los que tienen cadenas laterales polares sin carga en verde y aquellos con cadenas laterales hidrófobas en café. Como se discute en la siguiente sección, la decodificación en la célula la llevan a cabo los tRNA, algunos de los cuales se ilustran de forma esquemática en el lado derecho de la figura.

El hecho de que con frecuencia el mismo aminoácido es codificado por codones similares impide que muchas mutaciones tengan un impacto negativo en el organismo. Esta característica del código probablemente surgió en una etapa muy temprana de la historia de la vida como resultado directo de la selección natural. El aspecto de "margen de seguridad" del código va más allá de su degeneración. Las asignaciones de codones son tales que los aminoácidos similares tienden a ser especificados por codones semejantes. Por ejemplo, los codones de diferentes aminoácidos hidrófobos (mostrados en cuadros cafés en la figura 11-41) se agrupan en las primeras dos columnas de la carta. Por consecuencia, una mutación que resulte en una sustitución de base en uno de estos codones sustituye casi siempre un residuo hidrofóbico por otro. Además, las semejanzas principales entre aminoácidos y codones relacionados aparecen en los primeros dos nucleótidos del triplete, en tanto que la mayor variabilidad ocurre en el tercer nucleótido. Por ejemplo, a la glicina la codifican cuatro codones, todos los cuales comienzan con los nucleótidos GG. Una explicación de este fenómeno se analiza en la siguiente sección en la que se describe la función del RNA de transferencia.

REVISIÓN

1. Explique qué significa la expresión "el código genético es un triplete y no está superpuesto", ¿qué sugiere el dato de que la composición de bases del DNA varía

en gran medida entre diferentes organismos en relación con el código genético?, ¿cómo se estableció la identidad del codón UUU?

2. Diferencie los efectos de una sustitución de base en el DNA en un código no superpuesto y uno superpuesto.
3. Distinga entre un cambio de base sinónimo y otro no sinónimo.

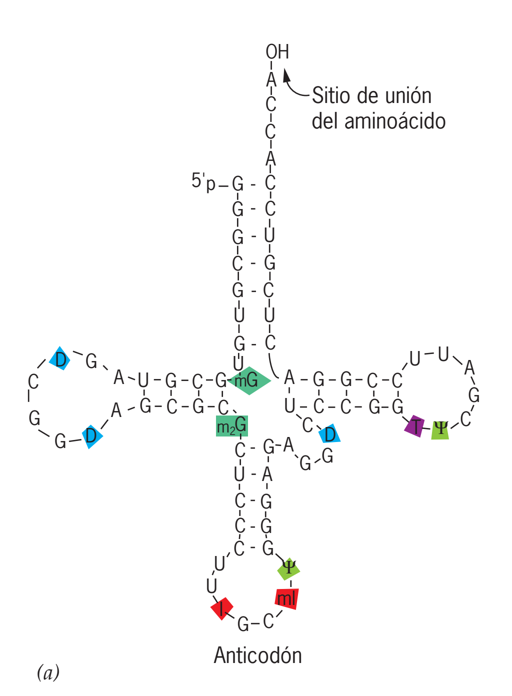
11.7 DECODIFICACIÓN DE LOS CODONES: LA FUNCIÓN DE LOS RNA DE TRANSFERENCIA

Los ácidos nucleicos y las proteínas son semejantes a dos lenguajes escritos con diferentes tipos de letras. Esta es la razón por la cual la síntesis de proteína se refiere como *traducción*. La traducción requiere que la información codificada en la secuencia nucleotídica de un mRNA se decodifique y utilice para dirigir el ensamble secuencial de aminoácidos en una cadena polipeptídica. Los RNA de transferencia, que actúan como adaptadores, llevan a cabo la decodificación de la información de un mRNA. Por un lado, cada tRNA se une a un aminoácido específico (como un aa-tRNA) y, por otro, el mismo tRNA puede reconocer un codón en particular en el mRNA. La interacción entre codones sucesivos en el mRNA y el aa-tRNA específico lleva a la síntesis de un polipéptido con una secuencia ordenada de aminoácidos. Para entender cómo sucede esto, primero se considera la estructura del tRNA.

La estructura de los tRNA

En 1965, luego de siete años de trabajo, Robert Holley de la *Cornell University* publicó la primera secuencia de bases de una molécula de RNA, la del RNA de transferencia de la levadura que porta al aminoácido alanina (fig. 11-42*a*). Este tRNA se compone de 77 nucleótidos, 10 de los cuales son modificaciones de cuatro nucleótidos estándar de RNA (A, G, C, U), como lo indica la sección sombreada de la figura.

En los años siguientes se purificaron y secuenciaron otras especies de tRNA y se observaron similitudes en los diferentes tRNA (fig. 11-42*b*). Todas estas moléculas constan del mismo número de nucleótidos, entre 73 y 93, y tienen un porcentaje significativo de bases raras que al parecer son el resultado de modificaciones enzimáticas de una de las cuatro bases estándar *después* de incorporarse a la cadena de RNA de una manera *postranscripcional*. Además, todos los tRNA poseen secuencias de nucleótidos en un segmento de la molécula que son complementarias de secuencias localizadas en otras partes de la molécula. A causa de estas secuencias complementarias, todos



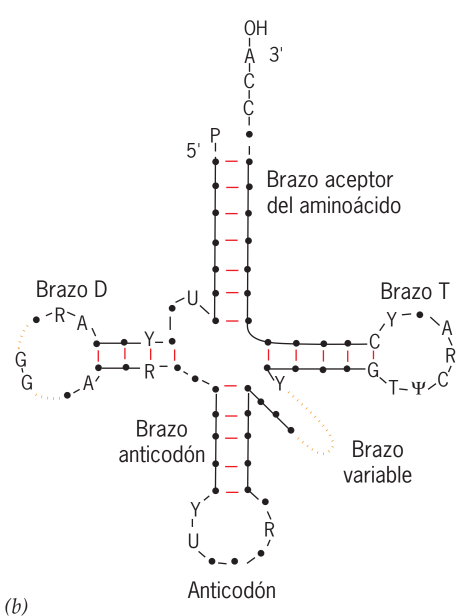


FIGURA 11-42 Estructura bidimensional de los RNA de transferencia. *a)* Secuencia nucleotídica de un tRNA^Ala de levadura en forma de trébol. El aminoácido se une al extremo 3′ del tRNA, mientras que el extremo opuesto porta el anticodón, en este caso IGC. La función del anticodón se discute más tarde. Aparte de las cuatro bases, A, U, G y C, este tRNA contiene ψ, seudouridina; T, ribotimidina; mI, metilinosina; I, inosina; me$_2$G, dimetilguanosina; D, dihidrouridina; meG, metilguanosina. Los sitios de las 10 bases modificadas en este tRNA se indican con el sombreado a color. *b)* Representación general del tRNA en forma de trébol. Las bases comunes a todos los tRNA (en procariotas y eucariotas) se indican con las siguientes letras: R es una purina invariable, Y una pirimidina invariable y ψ una seudouridina invariable. La variabilidad mayor entre los tRNA ocurre en el brazo V (variable), que oscila entre cuatro y 21 nucleótidos. Hay dos sitios de menor variabilidad a lo largo del brazo D.

los tRNA tienen la posibilidad de plegarse de manera parecida para formar una estructura que semeja una hoja de trébol. En la figura 11-42 se muestran los tallos con pares de bases y asas no pareadas de las hojas del trébol del tRNA. Las bases raras, que se encuentran en las asas, actúan para interrumpir la formación de puentes de hidrógeno en estas regiones y también sirven como sitios de reconocimiento para diferentes proteínas. Todos los tRNA maduros tienen la secuencia de tripletas CCA en su extremo 3′. Estos tres nucleótidos pueden ser codificados en el gen de tRNA (en muchos procariotas) o agregarse enzimáticamente (en eucariotas). En el segundo caso, una enzima con una sola función agrega los tres nucleótidos en el orden apropiado sin el beneficio de una plantilla de DNA o RNA.

Hasta este punto sólo se ha considerado la estructura secundaria o bidimensional de estas moléculas adaptadoras. Los RNA de transferencia pueden plegarse para formar una estructura terciaria única y definida. El análisis de difracción de rayos X muestra que los tRNA se integran con dos hélices dobles dispuestas en forma de L (fig. 11-43*b*). Las bases observadas en los sitios comparables en toda molécula de tRNA (bases *invariables* de la figura 11-42*b*) tienen importancia particular para formar la estructura terciaria común en forma de L. La forma común de los tRNA reflejan el hecho de que todos deben tomar parte en la misma serie de reacciones entre la síntesis de proteína. Sin embargo, cada tRNA posee características únicas que lo distinguen de otros tRNA. Como se menciona en la siguiente sección, son estas propiedades las que hacen posible que un aminoácido se fije de manera enzimática al tRNA apropiado (conocido).

Los RNA de transferencia traducen una secuencia de codones de mRNA en una secuencia de residuos aminoacídicos. La información contenida en el mRNA se decodifica a través de la formación de pares de bases entre secuencias complementarias en los RNA de transferencia y mensajero (véase fig. 11-50). Así, como en otros procesos en que intervienen ácidos nucleicos, la complementariedad entre pares de bases es el fundamento del proceso de traducción. La parte del tRNA que participa en esta interacción específica con el codón del mRNA es un tramo de tres nucleótidos secuenciales, denominado **anticodón**, que se localiza en el asa media de la molécula de tRNA (fig. 11-43*a*). Dicha asa se compone invariablemente de siete nucleótidos y los tres mediales forman un anticodón. El anticodón se sitúa en un extremo de la molécula de tRNA en forma de L opuesto al extremo al cual se une el aminoácido (fig. 11-43*b*).

Puesto que son 61 codones diferentes los que pueden especificar a un aminoácido, sería de esperar que una célula tuviera cuando menos 61 distintos tRNA, cada uno con un anticodón diferente complementario de uno de los codones de la figura 11-41. Pero hay que recordar que las similitudes más notorias entre codones que codifican el mismo aminoácido ocurren en los primeros dos nucleótidos del triplete, en tanto que la mayor variabilidad de estos mismos codones se observa en el tercer nucleótido del triplete. Considérense los 16 codones que termi-

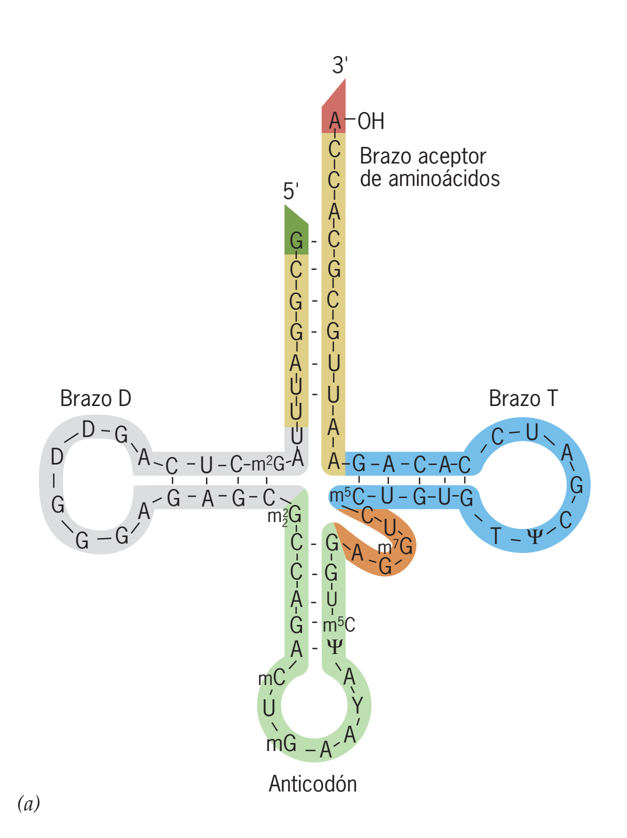


FIGURA 11-43 Estructura de un tRNA. *a*) Estructura bidimensional de un fenilalanil-tRNA de levadura con las diferentes regiones de la molécula en código de color para correlacionar con el dibujo de la parte *b*. *b*) Estructura tridimensional de un $tRNA^{Fen}$ derivado de la cristalografía de rayos X. El brazo aceptor amino (AA) y el brazo TψC (T) forman una doble hélice continua y el brazo del anticodón (AC) y el brazo D crean una doble hélice parcialmente continua. Estas dos columnas de hélices forman una molécula semejante a una L. (*B*, CORTESÍA DE MIKE CARSON.)

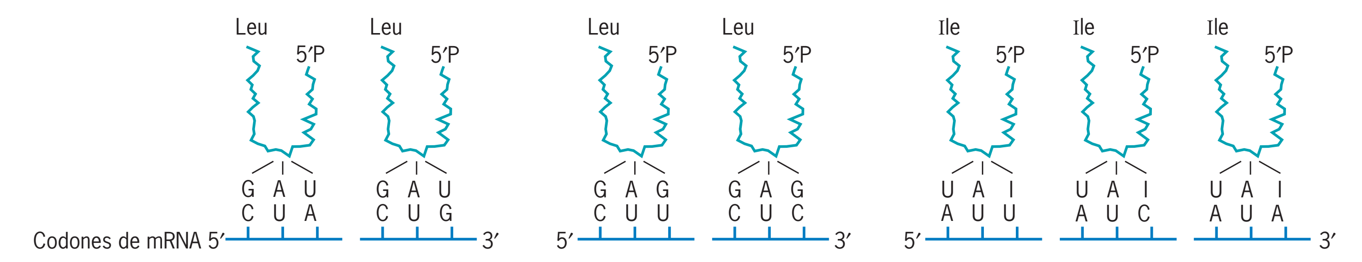


FIGURA 11-44 El bamboleo en la interacción entre codones y anticodones. En algunos casos, el nucleótido en el extremo 5′ terminal del tRNA anticodón es capaz de aparearse con más de un nucleótido en el extremo 3′ (tercera posición) del codón de mRNA. En consecuencia, más de un codón puede usar el mismo tRNA. Las reglas para el apareamiento en el esquema del bamboleo se indican en la figura y el texto.

nan en U. En cada caso, si la U cambia a C, se codifica el mismo aminoácido (primeras dos líneas de cada cuadro en la figura 11-41). De modo similar, en la mayoría de los casos, un cambio entre una A y una G en el tercer sitio tampoco tiene efecto en la determinación del aminoácido. La posibilidad de intercambiar la base de la tercera posición llevó a Francis Crick a proponer que el mismo RNA de transferencia podía reconocer más de un codón. Su propuesta, llamada *hipótesis del bamboleo*, sugería que el requerimiento estérico entre el anticodón del tRNA y el codón del mRNA podía ser muy estricto para las primeras dos posiciones y quizá más flexible en la tercera posición; esto permitía a dos codones que codifican el mismo aminoácido, y que sólo difieren en la tercera posición, emplear el mismo tRNA en la síntesis de proteínas. Una vez más, la hipótesis de Crick resultó correcta.

Las reglas que dominan la inestabilidad en la tercera posición del codón son las siguientes (fig. 11-44): la U del anticodón puede formar par con A o G del mRNA; la G del anticodón puede formar par con U o C del mRNA, y la I (inosina, derivada de la guanina en la molécula del tRNA original) del anticodón puede formar par con U, C o A del mRNA. Como resultado del bamboleo, los seis codones para leucina, por ejemplo, sólo requieren tres tRNA.

Activación de aminoácidos Durante la síntesis de polipéptidos es muy importante que cada molécula de RNA de transferencia se una al aminoácido correcto (conocido). Los aminoácidos se unen mediante enlaces covalentes a los extremos 3′ de su tRNA conocido por acción de una enzima llamada **sintetasa de aminoacil-tRNA** (**aaRS**) (fig. 11-45). Aunque existen muchas excepciones, los organismos típicamente contienen 20 sintetasas de aminoacil-tRNA, una para cada uno de los 20 aminoácidos que se incorporan a las proteínas. Cada una de las sintetasas es capaz de "cargar" todos los tRNA apropiados para ese aminoácido (es decir, cualquier tRNA cuyos anticodones reconozcan los diferentes codones específicos para ese aminoácido, como se indica en la figura 11-41). Las sintetasas de aminoacil-tRNA son excelente ejemplo de la especificidad de las interacciones proteína-ácido nucleico. Deben existir ciertas características comunes entre todas las especies de tRNA que codifican a un aminoácido determinado para permitir a una sintetasa de aminoacil-tRNA reconocer todos estos tRNA y al mismo tiempo discriminar todos los tRNA para otros aminoácidos. La información relacionada con las propiedades estructurales de los tRNA, gracias a la cual éstos pueden seleccionarse o rechazarse como sustratos, proviene de las siguientes dos fuentes:

1. Determinación de la estructura tridimensional de estas enzimas por medio de cristalografía de rayos X, lo que posibilita a los investigadores identificar qué sitios en el tRNA hacen contacto directo con la proteína. Como lo ilustra la figura 11-45, los dos extremos del tRNA (el brazo aceptor y el anticodón) son importantes para el reconocimiento de la mayoría de estas enzimas.
2. La determinación de los cambios en un tRNA que dan lugar a que una sintetasa desconocida aminoacile a la molécula. Por ejemplo, se ha encontrado que un par de bases específico en el $tRNA^{Ala}$ (el par de bases G-U incluye al tercer G del extremo 5′ de la molécula en la figura 11-42*a*) es el que determina, de manera primaria, su interacción con la sintetasa de alanil-tRNA. La inserción de este par de bases específico en el tallo aceptor de un $tRNA^{Fe}$ o un $tRNA^{Cis}$ es suficiente para hacer que la sintetasa de alanil-tRNA reconozca a estos tRNA y se aminoacilen con alanina.

FIGURA 11-45 Esquema tridimensional de la interacción entre un tRNA y su aminoacil-tRNA sintetasa. La estructura cristalina de la sintetasa de glutaminil-tRNA de *E. coli* (en azul) forma un complejo con el $tRNA^{Gln}$ (se indica en rojo y amarillo). La enzima reconoce este tRNA específico y discrimina otros a través de la interacción con el brazo aceptor y el anticodón del tRNA. (TOMADA DE THOMAS A. STEITZ, SCIENCE VOL. 246, PORTADA DEL 12/1/89; © AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE.)

Las sintetasas de aminoacil-tRNA llevan a cabo las siguientes reacciones en dos pasos:

Primer paso: ATP + aminoácido → aminoacil-AMP + PP_i
Segundo paso: aminoacil-AMP + tRNA
→ aminoacil-tRNA + AMP

En el primer paso, la energía del ATP activa al aminoácido por la formación de un aminoácido adenilado, el cual se une a la enzima. Este es el paso primario del requerimiento de energía de la reacción química que lleva a la síntesis del polipéptido. Los acontecimientos subsecuentes, como la transferencia de aminoácido a la molécula de tRNA (paso 2, véase antes) y al final el crecimiento de la cadena del polipéptido, son favorables desde el punto de vista termodinámico. El PP_i producido en la primera reacción se hidroliza a continuación para formar P_i, lo que fuerza aún más la reacción total hacia la formación de productos (pág. 433). Como se observa más adelante, la energía se expande durante la síntesis de proteína, pero no se utiliza en la formación de enlaces peptídicos. En el segundo paso, la enzima transfiere su aminoácido unido al extremo 3′ de un tRNA conocido. ¿Qué pasaría si la sintetasa coloca un aminoácido inapropiado en un tRNA, se activa un mecanismo de lectura y corrección de la enzima y se elimina la unión entre el aminoácido y el tRNA?[7]

REVISIÓN ?

1. ¿Por qué se dice de los tRNA que son moléculas adaptadoras?, ¿qué aspectos de la estructura de los tRNA tienen en común?
2. Describa la naturaleza de las interacciones entre los tRNA y las sintetasas de aminoacil-tRNA y el tipo de interacción entre tRNA y mRNA. ¿Cuál es la hipótesis del bamboleo?

11.8 TRADUCCIÓN DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA

La síntesis o **traducción** de proteínas es la actividad sintética más compleja en una célula. El ensamblado de una proteína requiere todos los diferentes tRNA con sus aminoácidos unidos, ribosomas, un RNA mensajero, algunas proteínas con funciones distintas, cationes y GTP (trifosfato de guanosina). La complejidad no es sorprendente si se considera que la síntesis de proteína necesita la incorporación de 20 diferentes aminoácidos en la secuencia precisa dirigida por un mensaje codificado en un lenguaje que emplea diversos elementos. En la descripción siguiente se analizan sobre todo los mecanismos de traducción que operan en las células bacterianas, que son más simples y mejor conocidos. El proceso es muy similar en las células eucariotas.

La síntesis de una cadena polipeptídica puede dividirse en tres actividades distintas: *inicio* de la cadena, *elongación* de la cadena y *terminación* de la cadena. A continuación se describe cada una de estas actividades.

Inicio

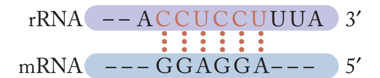
Una vez que se une a un mRNA, el ribosoma siempre se mueve a lo largo del mRNA de un codón al próximo, esto es, en bloques consecutivos de tres nucleótidos. Para asegurar que los tripletes se lean, el ribosoma se une al mRNA en un sitio preciso denominado **codón de inicio**, el cual se codifica como AUG. La unión a este codón pone al ribosoma de manera automática en el **marco de lectura** de tal modo que el ribosoma lee el mensaje entero, de manera correcta, desde este punto de inicio. Por ejemplo, en el caso siguiente,

—CUAGUUACAUGCUCCAGUCCGU—

el ribosoma se mueve del codón de inicio, AUG, a los próximos tres nucleótidos, CUC, y así de forma sucesiva a lo largo de toda la secuencia.

En la figura 11-46 se ilustran los pasos básicos del inicio de la traducción en las células procariotas.

Paso 1: traslado de la subunidad ribosomal pequeña al codón de inicio Como se advierte en la figura 11-46, un mRNA no se une a un ribosoma intacto, sino a las subunidades pequeña y grande en estadios separados. El primer gran paso de inicio es la unión de la subunidad ribosomal pequeña a la primera secuencia AUG (o una de las primeras) en el mensaje, que sirve como el codón de inicio.[8] ¿De qué manera la subunidad pequeña selecciona el codón inicial AUG a medida que se opone a uno interno? Los mRNA bacterianos poseen una secuencia específica de nucleótidos (secuencia Shine-Dalgarno, nombrada así por sus descubridores) que se localiza cinco a 10 nucleótidos antes del codón de inicio. La secuencia Shine-Dalgarno es complementaria de una secuencia de nucleótidos próxima al extremo 3′ del *RNA ribosomal* 16S de la subunidad ribosomal pequeña.



La interacción entre estas secuencias complementarias en el mRNA y el rRNA lleva a la unión de la subunidad 30S al codón de inicio AUG.

Para el inicio se requieren factores de inicio Varios de los pasos que se describen en la figura 11-46 requieren la ayuda de proteínas solubles, los denominados **factores de inicio** (designados como IF en procariotas y eIF en eucariotas). Las células bacterianas necesitan tres factores de inicio (IF1, IF2 e IF3), los

[7] No todas las sintetasas de aa-tRNA poseen este tipo de mecanismo de lectura y corrección. Algunas remueven un aminoácido incorrecto tras hidrolizar la unión aminoacil-AMP seguida del primer paso de reacción. Los dos aminoácidos más difíciles de distinguir son la valina y la isoleucina, que difieren por un solo grupo metileno (fig. 2-26). La sintetasa de isoleucil-tRNA emplea los dos tipos de mecanismos de lectura y corrección que aseguran una aminoacilación correcta.

[8] GUG también es capaz de servir como un codón de inicio y se encuentra en una cantidad muy pequeña de mensajes naturales. Cuando se utiliza GUG, la *N*-formilmetionina no deja de usarse para formar el complejo de inicio a pesar del hecho de que los codones GUG internos codifican a la valina.

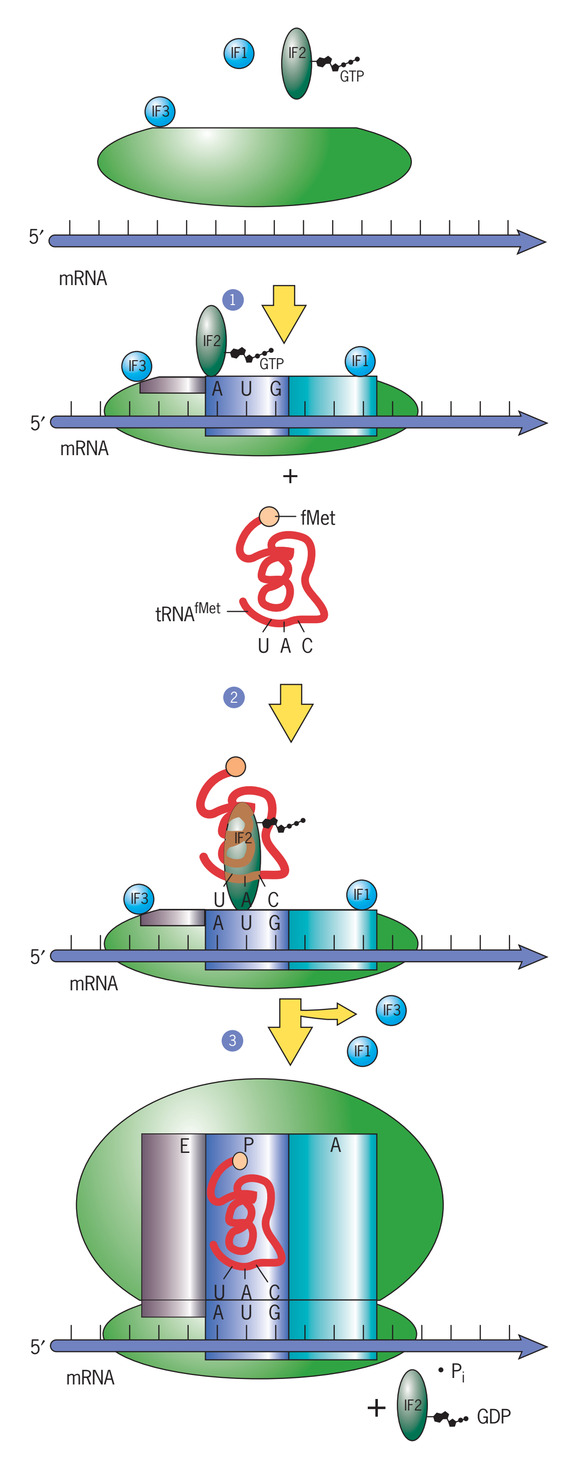


FIGURA 11-46 Inicio de la síntesis de proteínas en bacterias. En el paso 1, el inicio de la traducción comienza con la vinculación de la subunidad ribosomal 30S con el mRNA en el codón de inicio AUG, un paso que requiere IF1 e IF3. La subunidad ribosomal 30S se une al mRNA en el codón de inicio AUG como resultado de una interacción entre una secuencia nucleotídica complementaria en el rRNA y mRNA, como se discute en el texto. En el paso 2, la formilmetionil-tRNA^{fMet} se relaciona con el mRNA y el complejo de la subunidad ribosomal 30S mediante el enlace a IF2-GTP. En el paso 3, la subunidad 50S se une al complejo, el GTP se hidroliza y el IF2-GDP se libera. El tRNA iniciador entra al sitio P del ribosoma, mientras que todos los tRNA subsecuentes ingresan al sitio A (véase fig. 11-49).

cuales se unen a la subunidad 30S (paso 1, fig. 11-46). El IF2 es una proteína que une GTP requerido para la unión del primer aminoacil-tRNA. El IF3 puede prevenir que la subunidad grande (50S) se una en forma prematura a la subunidad pequeña 30S y también facilita la entrada del aa-tRNA inicial. El IF1 facilita la unión de la subunidad 30S al mRNA y puede prevenir que el aa-tRNA entre a un sitio erróneo en el ribosoma.

Paso 2: traslado del primer aa-tRNA al ribosoma Si se examinan las asignaciones de codones (fig. 11-41), se puede observar que AUG codifica no tan sólo al codón de inicio; es el único codón que codifica a la metionina. En realidad, la metionina siempre es el primer aminoácido que se incorpora en el extremo aminoterminal de la cadena naciente del polipéptido. (En procariotas, la metionina inicial porta un grupo formilo, que la convierte en *N*-formilmetionina.) En muchos casos, la metionina (o *N*-formilmetionina) se elimina con posterioridad por medio de una enzima. Las células poseen dos metionil-tRNA: uno se utiliza en el inicio de la síntesis de proteína y otro diferente para incorporar residuos de metionilo en el interior del polipéptido. El aa-tRNA iniciador entra en el sitio P del ribosoma (que se discute más adelante) donde se une a los codones AUG del mRNA y el factor de inicio IF2 (paso 2, fig. 11-46). IF1 e IF3 se liberan.

Paso 3: ensamblado del complejo de inicio completo Una vez que el tRNA iniciador se une al codón AUG y el IF3 se desplaza, la subunidad grande se une al complejo y el GTP unido a IF2 se hidroliza (paso 3, fig. 11-46). Es probable que la hidrólisis de GTP genere un cambio conformacional en el ribosoma necesario para la liberación de IF2-GDP.

Inicio de la traducción en eucariotas Las células eucariotas requieren por lo menos 12 factores de inicio que incluyen un total de más de 25 cadenas polipeptídicas. Como se indica en la figura 11-47, varios de estos eIF (p. ej., eIF1, eIF1A, eIF5 y eIF3) se unen a la subunidad 40S, que prepara a la subunidad para su unión con el mRNA. El tRNA iniciador unido a una

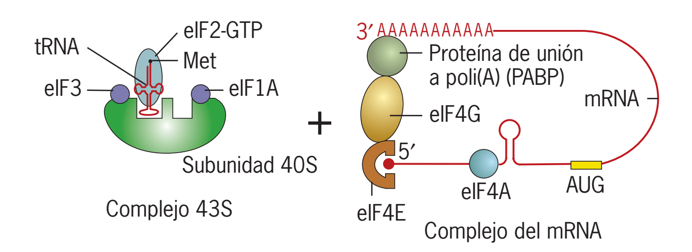


FIGURA 11-47 Inicio de la síntesis de proteínas en eucariotas. Como se señala en el texto, el inicio comienza con la unión de dos complejos, uno (llamado complejo 43S) contiene la subunidad ribosomal 40S unida a varios factores de inicio (eIF) y el tRNA iniciador, mientras que el otro posee el mRNA unido a un grupo separado de factores de inicio. Esta unión es mediada por una interacción entre eIF3 en el complejo de 43S y eIF4G en el complejo del mRNA. Una vez que el complejo de 43S se ha unido al extremo 5′ del mRNA, recorre el mensaje hasta alcanzar el codón de inicio apropiado AUG.

metionina también se une a una subunidad 40S antes de su interacción con el mRNA. El tRNA iniciador entra en el sitio P de la subunidad en asociación con eIF2-GTP. Una vez que estos sucesos se llevan a cabo, la subunidad ribosomal pequeña con sus factores de inicio relacionados y el tRNA (que juntos integran un complejo de preinicio 43S) está listo para encontrar el extremo 5′ del mRNA, que tiene el casquete de metilguanosina (pág. 452).

Al principio, el complejo 43S se desplaza hacia el mRNA con la ayuda de un grupo de factores de inicio que ya se encuentran unidos al mRNA (fig. 11-47). Entre estos factores figuran los siguientes: a) el eIF4E se une al casquete 5′ del mRNA de eucariotas; b) el eIF4A se moviliza a lo largo del extremo 5′ del mensaje y remueve cualquier región de doble cadena que podría interferir con el movimiento del complejo 43S a lo largo del mRNA, y c) el eIF4G sirve como un puente entre el extremo 5′ con el casquete y el extremo 3′ poliadenilado del mRNA (fig. 11-47). De esta forma, el eIF4G convierte un mRNA lineal en un mensaje circular.

Una vez que el 43S se une al extremo 5′ del mRNA, el complejo recorre el mensaje hasta alcanzar una secuencia nucleotídica que reconoce (en general el 5′—CCACCAUGC—3′) que contiene el codón de inicio AUG. Luego que el complejo 43S alcanza al codón apropiado AUG, eIF2-GTP se hidroliza, eIF2-GDP (y otros eIF asociados) se eliminan y la subunidad grande (60S) se une al complejo para completar el inicio.[9]

La función del ribosoma Tras alcanzar el punto en el cual se ha ensamblado por completo un ribosoma, es posible ver de manera más detallada la estructura y función de esta estructura de múltiples subunidades. Los ribosomas son máquinas moleculares, similares en algunos aspectos a los motores moleculares descritos en el capítulo 9. Durante la traducción, un ribosoma sufre un ciclo repetitivo de cambios mecánicos que se realizan con la liberación de energía por la hidrólisis de GTP. A diferencia de la miosina o la cinesina, las cuales de forma simple se mueven a lo largo de una estructura física, los ribosomas se desplazan a lo largo de una cinta de mRNA (que contiene la información codificada). En otras palabras, los ribosomas son máquinas *programables*: la información almacenada en los mRNA determina la secuencia de los aminoacil-tRNA que el ribosoma acepta durante la traducción. Otra característica que distingue a los ribosomas de muchas otras máquinas celulares es la importancia de los RNA que lo componen. Los RNA ribosomales ejercen funciones esenciales en la selección de los tRNA y aseguran una traducción precisa al unir factores proteicos y polimerizar aminoácidos (se discute en la sección Vías experimentales al final del capítulo).

En años pasados progresó mucho la comprensión de la estructura de los ribosomas bacterianos. Los estudios iniciales que emplearon la microscopia crioelectrónica de alta resolución (sección 18.8) revelaron que el ribosoma tenía una estructura muy irregular con lóbulos, protuberancias, canales y puentes (véase fig. 2-55). Estos estudios también arrojaron información sobre los principales cambios conformacionales que ocurren en las subunidades pequeña y grande durante la traducción. En la década de 1990 se realizaron grandes avances en la cristalización de ribosomas y al final del decenio ya había aparecido el primer informe de cristalografía de rayos X de la estructura de los ribosomas bacterianos. Las figuras 11-48*a* y *b* muestran la estructura de dos subunidades ribosómicas de un ribosoma procariota según lo define la cristalografía de rayos X.

Cada ribosoma tiene tres sitios para la vinculación con moléculas de RNA de transferencia. Estos sitios, denominados **sitio A** (**aminoacilo**), **sitio P** (**peptidilo**) y **sitio E** (**de salida**), reciben cada tRNA en pasos sucesivos del ciclo de elongación, como se describe en la siguiente sección. Las posiciones del tRNA unido a los sitios A, P y E de las subunidades pequeña y grande de los ribosomas se muestran en la figura 11-48*a*, *b*. Los tRNA se unen dentro de estos sitios y abarcan el espacio entre las dos unidades ribosómicas (fig. 11-48*c*). Los extremos de los anticodones de los tRNA unidos hacen contacto con la subunidad pequeña, la cual tiene una función importante al decodificar la información contenida en el RNA mensajero. En cambio, los extremos que unen a los aminoácidos del tRNA contactan a la subunidad grande, que posee una función relevante al catalizar la formación del enlace peptídico. Otras características reveladas por estudios estructurales de alta resolución incluyen las siguientes:

1. La interfase entre las subunidades grande y pequeña forma una cavidad relativamente espaciosa (fig. 11-48*c*) ocupada casi de modo exclusivo por RNA. La cadena lateral de la subunidad pequeña que limita a esta cavidad se extiende a lo largo de una hélice continua de doble cadena de RNA. Esta hélice aparece sombreada en la estructura bidimensional del rRNA 16S en la figura 11-3. Las superficies de las dos subunidades que se limitan la una a la otra contienen los sitios de unión para el mRNA y el tRNA que entra y son de importancia clave para la función del ribosoma. El hecho de que estas superficies se integren en su mayor parte con RNA apoya la propuesta de que los ribosomas primigenios estaban formados casi de forma exclusiva por RNA (pág. 458).
2. El sitio activo, donde se unen de modo covalente los aminoácidos, también se conforma con RNA. Esta porción catalítica de la subunidad grande reside en una cavidad profunda, la cual protege al enlace peptídico recién formado de la hidrólisis por el solvente acuoso.
3. El RNA mensajero se halla en un canal estrecho que rodea el cuello de la subunidad pequeña y pasa a través de los sitios A, P y E. Antes de ingresar en el sitio A, el mRNA es despojado de cualquier estructura secundaria que pudiera tener actividad por una helicasa ribosómica recién descubierta.
4. Un túnel se proyecta a través del núcleo de la subunidad grande desde el sitio activo. Dicho túnel provee una vía de paso para la translocación del polipéptido durante la elongación a través del ribosoma (fig. 11-48*c*).
5. La mayoría de las proteínas de las subunidades ribosomales tiene múltiples sitios de unión a RNA y se ubica en posiciones ideales para estabilizar la estructura terciaria del complejo del rRNA.

[9]No todos los mRNA se traducen a partir de la unión de la subunidad ribosomal pequeña en el extremo 5′ del mensaje. Muchos mRNA víricos y un pequeño número de mRNA celulares, casi siempre utilizados durante la mitosis o los periodos de estrés, se traducen como efecto de la unión del ribosoma al mRNA en un *sitio ribosómico interno de entrada* (*IRES*), el cual puede localizarse a cierta distancia del extremo 5′ del mensaje.

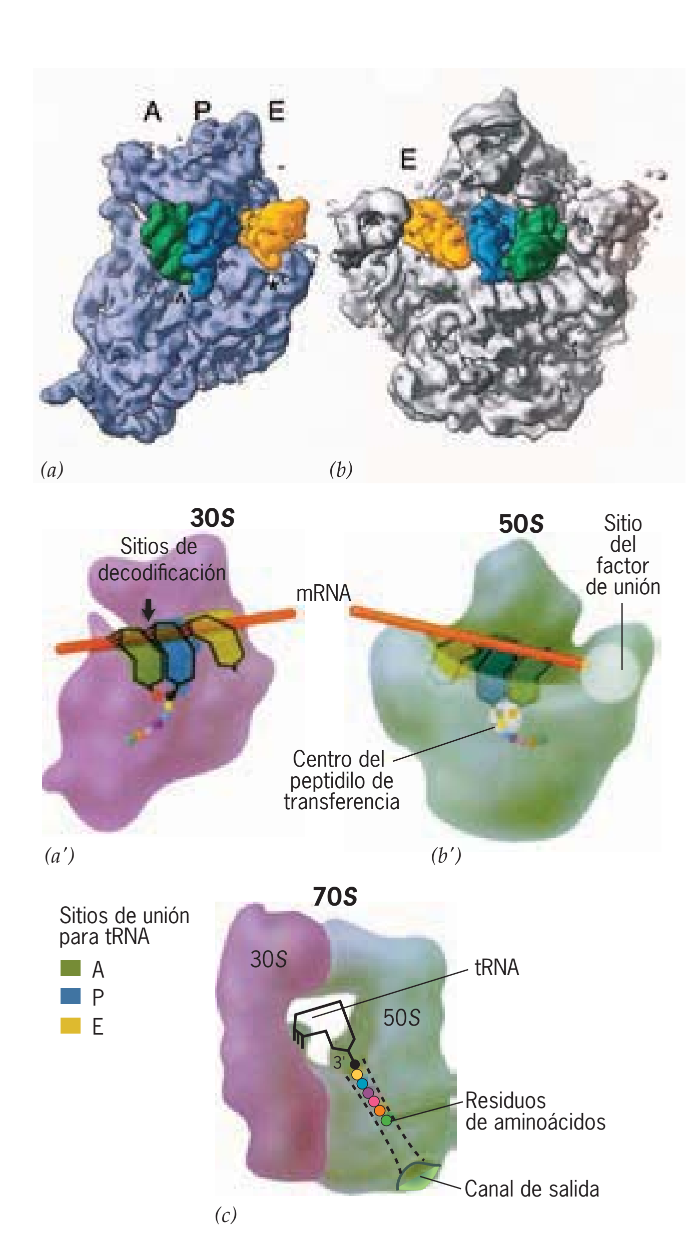


FIGURA 11-48 Modelo de un ribosoma bacteriano basado en datos de cristalografía de rayos X que muestra los tRNA unidos a los sitios A, P y E de las dos subunidades ribosomales. *a-b*) Vista de las subunidades 30S y 50S, respectivamente, con los tres tRNA unidos mostrados en la interfaz entre las subunidades. *a′* y *b′*, representaciones que corresponden a las estructuras que aparecen en las partes *a* y *b*. El dibujo en *a′* de la subunidad 30S ilustra las localizaciones aproximadas de los anticodones de los tres tRNA y sus interacciones con los codones complementarios del mRNA. El dibujo en *b′* de la subunidad 50S muestra los sitios del tRNA en dirección inversa. El aceptor terminal de aminoácidos de los tRNA de los sitios A y P están muy próximos en el sitio del peptidilo de transferencia de la subunidad, en donde ocurre la formación del enlace peptídico. Los sitios de unión para los factores de elongación EF-Tu y EF-G se hallan en la protuberancia hacia el lado derecho de la subunidad. *c*) Dibujo del ribosoma procariota 70S que señala el espacio entre las dos subunidades ocupado por cada molécula de tRNA y el canal dentro de la subunidad 50S a través de la cual el polipéptido recién formado sale del ribosoma. (*A* y *B*, tomada de Jamie H. Cate et al., cortesía de Harry F. Noller, Science 285:2100, 1999; *A′*, *B′* y *C*, tomadas de A. Liljas, Science 285:2078, 1999; © 1999 American Association for the Advancement of Science.)

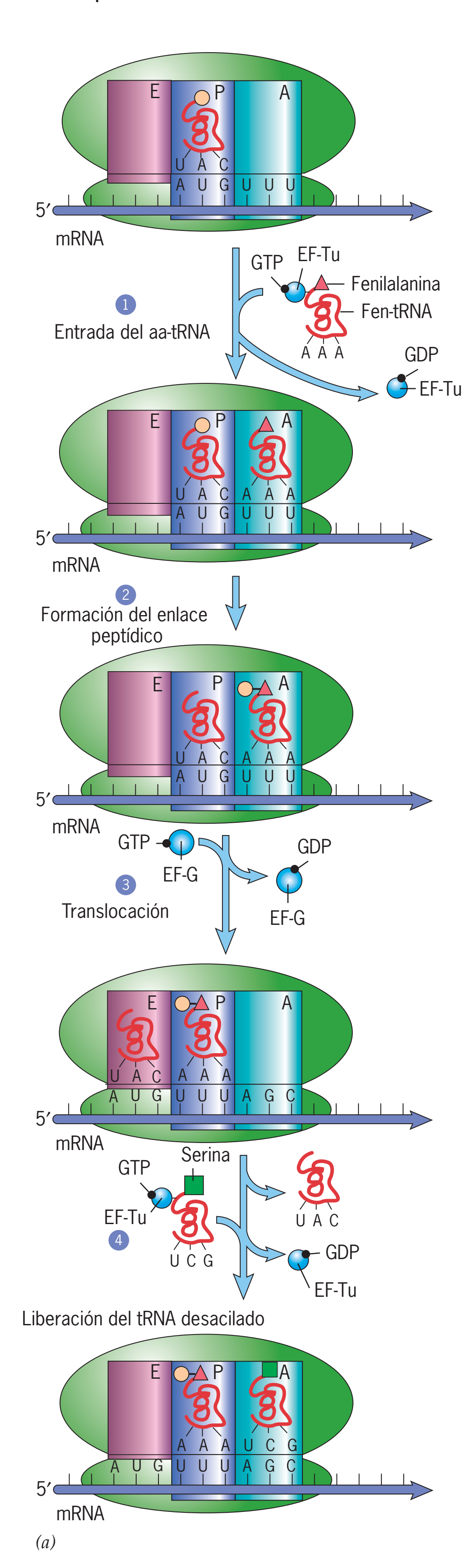
Elongación

En la figura 11-49 se ilustran los pasos básicos del proceso de elongación de la traducción en procariotas.

Paso 1: selección del aminoacil-tRNA Con el tRNA iniciador cargado y en posición dentro del sitio P, el ribosoma queda disponible para la entrada de un segundo aminoacil-tRNA en el sitio A vacante, lo cual representa el primer paso de la elongación (paso 1, fig. 11-49*a*). Antes de que el segundo aminoacil-tRNA se una de manera eficiente al mRNA expuesto en el sitio A, debe combinarse con un factor de elongación de proteína unido a GTP. Este factor de elongación particular se conoce como EF-Tu (o Tu) en procariotas y eEF1α en eucariotas. El EF-Tu se requiere para liberar los aminoacil-tRNA hacia el sitio A del ribosoma. Aunque cualquier complejo aminoacil-tRNA—Tu-GTP puede ingresar al sitio, sólo el que tiene el anticodón complementario del codón del mRNA alojado en el sitio A activará los cambios conformacionales necesarios dentro del ribosoma que hacen que el tRNA permanezca unido al mRNA en el centro de decodificación. Una vez que el aminoacil-tRNA—Tu-GTP correcto se une al codón del mRNA, el GTP se hidroliza y el complejo Tu-GDP se libera, con lo cual se abandona el aa-tRNA unido al sitio A del ribosoma. La regeneración de Tu-GTP a partir del Tu-GDP liberado requiere otro factor de elongación, el EF-Ts.

Paso 2: formación del enlace peptídico Al final del primer paso, los dos aminoácidos, unidos a sus tRNA separados, se yuxtaponen en una posición en la que pueden reaccionar entre sí (fig. 11-48*a′*, *b′*). El segundo paso en el ciclo de elongación es la formación de un enlace peptídico entre estos dos aminoácidos (paso 2, fig. 11-49*a*). La formación del enlace peptídico se realiza cuando el grupo amino del aa-tRNA en el sitio A reacciona con el grupo carbonilo del aminoácido unido al tRNA del sitio P, con lo que se desplaza el tRNA del sitio P (fig. 11-49*b*). Como resultado de esta reacción, el tRNA unido al segundo codón en el sitio A tiene un dipéptido unido y así el tRNA en el sitio P se desacila. La formación del enlace peptídico ocurre de manera espontánea sin la utilización de energía externa. La **transferasa de peptidilo**, un componente de la subunidad grande ribosomal, cataliza la reacción. Durante años se asumió que la transferasa de peptidilo era una de las proteínas del ribosoma. Sin embargo, conforme resultó evidente la potencia catalítica del RNA, la atención se volvió al RNA ribosomal como catalizador para formación de enlaces peptídicos. En la actualidad se ha demostrado que la actividad de la transferasa de peptidilo reside en la molécula ribosomal grande de RNA de la subunidad ribosomal grande (véase la fotografía en la página inicial de este capítulo). En otras palabras, la transferasa de peptidilo es una ribozima (se describe en la sección Vías experimentales al final del capítulo).

Paso 3: translocación La formación del primer enlace peptídico deja un extremo de la molécula de tRNA del sitio A todavía fijado a su codón complementario sobre el mRNA y el otro extremo de la molécula fijado a un dipéptido (paso 2, fig. 11-49*a*). El tRNA del sitio P queda entonces desprovisto del aminoácido. El siguiente paso, conocido como **translocación**, se caracteriza por cambios notorios en la posición entre las dos subunidades del ribosoma. Como resultado, el ribosoma se mue-



Péptido—C(H)(R)—C(=O)—O—tRNA$_1$ ← :NH$_2$—C(H)(R')—C(=O)—O—tRNA$_2$

Sitio P Sitio A

Péptido—C(H)(R)—C(=O)—N(H)—C(H)(R')—C(=O)—O—tRNA$_2$ + tRNA$_1$

(b)

FIGURA 11-49 Pasos en la elongación del polipéptido recién formado durante la traducción en las bacterias. *a*) En el paso 1, un aminoacil-tRNA cuyo anticodón es complementario del segundo codón del mRNA entra al espacio vacío A del ribosoma. La unión del tRNA se acompaña de la liberación de EF-Tu-GDP. En el paso 2, la formación del enlace peptídico se acompaña de la transferencia de la cadena polipeptídica naciente desde el tRNA en el sitio P hacia el amino-acil-tRNA en el sitio A, con lo cual se forma un dipeptidil-tRNA en el sitio A y un tRNA desacilado en el sitio P. La reacción la cataliza en parte el rRNA que actúa como ribozima. En el paso 3, la unión de EF-G y la hidrólisis de su GTP adjunto resultan en la translocación del ribosoma sobre el RNA mensajero. La translocación opera junto con el movimiento del tRNA desacilado y la peptidil-tRNA en los sitios E y P, respectivamente. En el paso 4, el tRNA desacilado deja el ribosoma y un nuevo aminoacil-tRNA entra al sitio A. *b*) Formación del enlace peptídico y el desplazamiento posterior del tRNA desacilado.

ve tres nucleótidos (un codón) a lo largo del mRNA en dirección 5′ → 3′ (paso 3, fig. 11-49*a*). La translocación se acompaña por el movimiento del dipéptido con tRNA del sitio A al sitio P del ribosoma, todavía enlazado mediante un puente de hidrógeno al segundo codón del mRNA, y el movimiento del tRNA desacilado del sitio P al sitio E. Al parecer, la translocación se lleva a cabo por cambios conformacionales en otro factor de elongación (EF-G en procariotas y eEF2 en eucariotas) tras la hidrólisis de su GTP relacionado.

Paso 4: liberación del tRNA desacilado En el paso final (paso 4, fig. 11-49*a*), el tRNA desacilado abandona al ribosoma y queda vacío el sitio E.

Por cada ciclo de elongación, por lo menos dos moléculas de GTP se hidrolizan: una durante la selección del aminoacil-tRNA y una durante la translocación. Cada ciclo de elongación toma alrededor de la veinteava parte de un segundo, la mayor parte de ese lapso tal vez perdido en buscar los aa-tRNA del

citosol circundante. Una vez que el peptidil-tRNA se ha movido del sitio P por translocación, el sitio A está de nueva cuenta disponible para la entrada de otro aminoacil-tRNA, en este caso uno con un anticodón complementario del tercer codón (paso 4, fig. 11-49*a*). Cuando el tercer tRNA cargado se vincula con el mRNA en el sitio A, el dipéptido del tRNA del sitio P se transfiere al aa-tRNA del sitio A y forma el segundo enlace peptídico y, en consecuencia, un tripéptido fijado al tRNA del sitio A. El tRNA del sitio P otra vez se encuentra desprovisto del aminoácido.

A la formación de enlaces peptídicos le sigue la translocación del ribosoma al cuarto codón y la expulsión del tRNA desacilado y el ciclo está listo para comenzar otra vez.

Se ha visto en esta sección cómo el ribosoma se mueve tres nucleótidos (un codón) a la vez a lo largo del mRNA. La secuencia particular de codones en el mRNA que utiliza un ribosoma (p. ej., el marco de lectura) se fija en el momento en que el ribosoma se une al codón de inicio al comienzo de la traducción. Algunas de las mutaciones más deletéreas son aquellas en las que un solo par de bases se agrega o se elimina del DNA. Considérese el efecto de la adición de un solo nucleótido a la siguiente secuencia:

—AUG CUC CAG UCC GU →
—AUG CUC GCA GUC CGU—

El ribosoma se mueve a lo largo del mRNA en un marco de lectura incorrecto desde el punto de la mutación a través del resto de la secuencia codificante. Las mutaciones de este tipo se conocen como **mutaciones de marco de lectura equivocado**. Tales mutaciones codifican una secuencia del todo anormal de aminoácidos desde el punto donde ocurrió la mutación. Puede observarse que, después de más de dos décadas en las cuales se asumió que el ribosoma siempre se mueve de un triplete al próximo, se descubrieron varios ejemplos en los que los mRNA contenían una señal de recodificación que daba lugar a que el ribosoma cambiara su marco de lectura, ya sea al retrasar un nucleótido (un regreso a –1 en la lectura) o saltar un nucleótido (un avance a +1 en el marco de lectura).

Una gran cantidad de antibióticos ejerce su efecto al interferir con diferentes aspectos de la síntesis de proteínas en células bacterianas. Por ejemplo, la estreptomicina actúa por medio de la unión selectiva a la subunidad ribosomal pequeña de las bacterias y provoca que ciertos codones del mRNA se lean de manera errónea, de tal modo que se incrementa la síntesis de proteínas aberrantes. Debido a que el antibiótico no se une a los ribosomas eucariotas, carece de efecto en la traducción en el mRNA de la célula hospedadora. La resistencia por parte de la bacteria a la estreptomicina puede estudiarse al observar los cambios de las proteínas ribosomales, en particular S12.

Terminación

Como se muestra en la figura 11-41, tres de los 64 codones trinucleotídicos funcionan como codones de terminación que concluyen el ensamblado del polipéptido en lugar de codificar un aminoácido. No existen tRNA cuyos anticodones sean complementarios de los codones de detención.[10] Cuando el ribosoma alcanza uno de estos codones, UAA, UAG o UGA, la señal interpretada es la de detener todo el alargamiento adicional y liberar al polipéptido relacionado hacia el último tRNA.

La terminación requiere *factores de liberación*. Las bacterias tienen tres de ellos: RF1, que reconoce los codones de terminación UAA y UAG; el RF2, para los codones de terminación UAA y UGA, y el factor RF3, que no reconoce los codones específicos pero que incrementa la actividad de otros factores. Las células eucariotas poseen dos factores de liberación, eRF1 y eRF3, que trabajan de forma conjunta y reconocen todos los codones de terminación. Los factores de liberación que reconocen codones (RF1, RF2 y eRF1) entran en el sitio A del ribosoma. Un tripéptido conservado en un extremo de los factores de liberación interactúa al parecer de modo directo con el codón de terminación en el sitio A, como lo haría el anticodón de la molécula de tRNA con un codón de sentido en ese sitio. Entonces se hidroliza el enlace éster que une a la cadena del polipéptido naciente con el tRNA y el polipéptido completo se libera. Como sucede con los factores de inicio y elongación, uno de estos factores liberadores (RF3 o eRF3) es una proteína G que une GTP. El papel preciso de esta proteína es poco claro. Una vez que se completa la terminación, el ribosoma se disocia de sus subunidades grande y pequeña y se prepara para iniciar otro ciclo de traducción.

Vigilancia del mRNA: no se permiten codones sin sentido

Debido a que los tres codones de terminación pueden formarse por cambios de una sola base de muchos otros codones (véase fig. 11-41), cabe esperar mutaciones que produzcan codones de detención dentro de la secuencia codificante de un gen. Las mutaciones de este tipo, denominadas **mutaciones de sentido equivocado**, se han estudiado por décadas y a ellas se atribuye cerca de 30% de las alteraciones hereditarias en seres humanos. Los codones de terminación prematura, como también se les llama, son asimismo introducidos comúnmente en los mRNA durante el empalme. Las células poseen un mecanismo de vigilancia del mRNA capaz de detectar mensajes con codones de terminación prematuros. En la mayoría de los casos, los mRNA que contienen tales mutaciones se traducen sólo una vez antes de destruirse de manera selectiva por un proceso llamado decaimiento mediado por **mutación de sentido equivocado** (**NMD**).

[10] Existen excepciones menores a este enunciado. Se ha señalado en el capítulo que los codones determinan la incorporación de 20 diferentes aminoácidos. En el estado actual de los hechos, hay un aminoácido 21, el denominado selenocisteína, que se incorpora dentro de un pequeño número de polipéptidos. La selenocisteína es un aminoácido raro que contiene al metal selenio. Por ejemplo, en mamíferos esto ocurre en una docena de proteínas. La selenocisteína tiene su propio tRNA, llamado $tRNA^{Sec}$, pero no posee su propia sintetasa de aa-tRNA. Este tRNA en particular lo reconoce la sintetasa de seril-tRNA, la cual se une a una serina en el extremo 3′ del $tRNA^{Sec}$. Después de la unión, la serina se altera de manera enzimática y crea una selenocisteína. A ésta la codifica el codón UGA, que es uno de los tres codones de terminación. En la mayoría de las circunstancias, el UGA se interpreta como una señal de terminación. Sin embargo, en unos cuantos casos al UGA le sigue una región de plegamiento en el mRNA que se une a un factor de elongación especial que da lugar a que el ribosoma sea capaz de reclutar un $tRNA^{Sec}$ en el sitio A más que un factor de terminación. Un vigésimo segundo aminoácido, pirrolisina, es codificado por otro codón de terminación (UAG) en el código genético de algunas arqueas. La pirrolisina tiene sus propios tRNA y sintetasa de aa-tRNA.

El sistema NMD protege a la célula de la producción de proteínas cortas no funcionales.

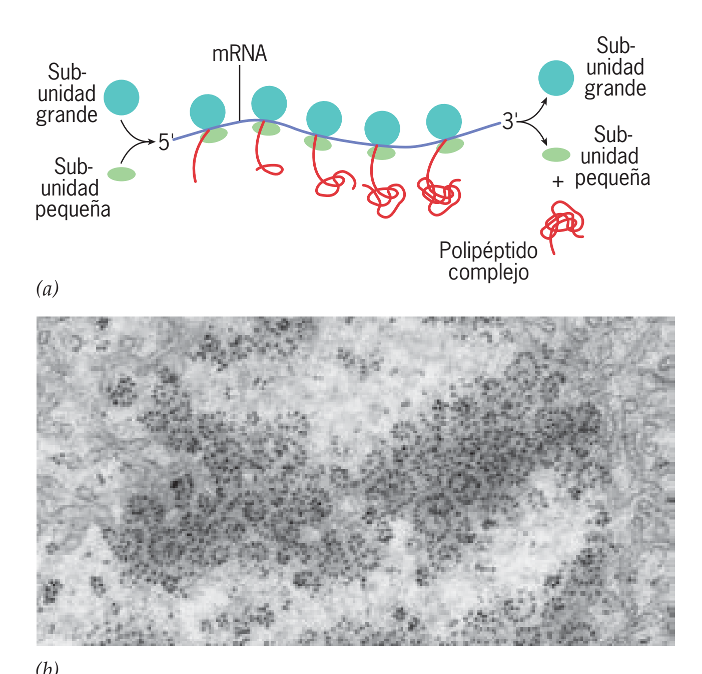
¿Cómo puede una célula distinguir entre un codón de terminación legítimo que se supone termina la traducción de un mensaje y un codón de terminación prematura? Para resolver este acertijo, deben recordarse los sucesos que ocurren durante el procesamiento del pre-mRNA en las células de los mamíferos. No se mencionó antes, pero cuando un espliceosoma remueve un intrón, un complejo de proteínas se deposita en el transcrito 20 a 24 nucleótidos corriente arriba de la unión exón-exón recién formada. Este conglomerado de proteínas se conoce como **complejo de unión exónico** (**EJC**, del inglés *exon-junction complex*), el cual permanece unido al mRNA hasta que éste se traduce (véase fig. 12-8). Se piensa que cuando un mRNA sufre su ciclo inicial de traducción, los EJC son desplazados por el avance en el ribosoma. Considérese lo que pasaría durante la traducción de un mRNA que tuviera un codón de terminación prematura. El ribosoma se detendría en el sitio de la mutación y entonces se disociaría, dejando cualesquiera EJC que estuviera unido al mRNA corriente abajo del sitio de la terminación prematura. Por tanto, la presencia de uno o más EJC en un mRNA traducido sirve como una "marca" indeleble que identifica al mRNA como una transcripción defectuosa. Esto pone en marcha una serie de sucesos que llevan a la destrucción enzimática del mensaje anormal.

El NMD es mejor conocido por su cometido en la eliminación de mRNA transcrito desde genes mutantes, como los responsables de la fibrosis quística o la distrofia muscular. Varias empresas de biotecnología están desarrollando fármacos que interfieren la acción del NMD y permiten que mRNA con codones sin sentido sean traducidos en proteínas. En la actualidad, pacientes con fibrosis quística y con distrofia muscular reciben tales fármacos en ensayos clínicos. Aunque la proteína codificada por el gen mutante será anormalmente corta, es posible que aun así tenga suficiente actividad residual para rescatar al paciente de una enfermedad que es letal en caso contrario.

El NMD sirve como otro recordatorio de la naturaleza oportunista de la evolución biológica. Como la evolución ha "tomado ventaja" de la presencia de intrones para facilitar el intercambio de exones (pág. 458), también se ha utilizado el proceso por el cual estos insertos genéticos se remueven para establecer un mecanismo de control de calidad, el cual asegura que sólo el mRNA íntegro avance a un estado en el que puede traducirse.

Polirribosomas

Cuando un RNA mensajero sometido a traducción se examina por medio de microscopia electrónica, se observa que diferentes ribosomas están unidos a lo largo de la cadena del mRNA. Este complejo ribosomal unido al mRNA se conoce como **polirribosoma** o **polisoma** (fig. 11-50*a*). De manera inicial, cada uno de los ribosomas se ensambla a partir de sus subunidades en el codón de inicio y luego se desplaza hacia el extremo 3′ del



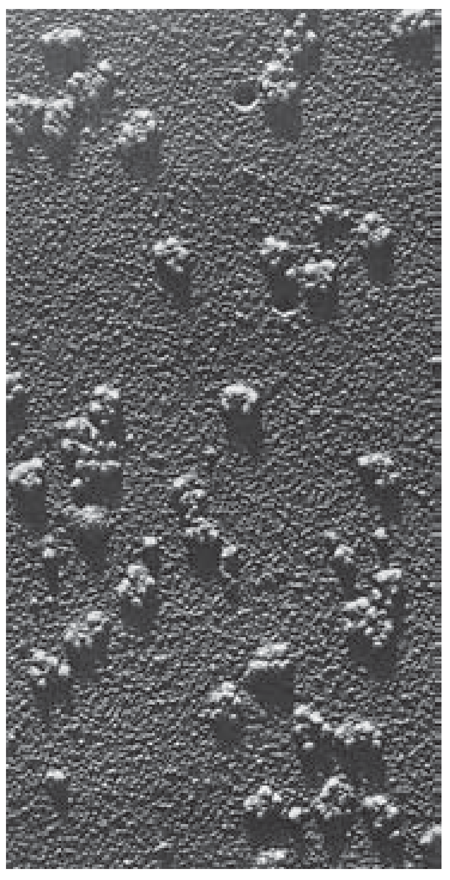
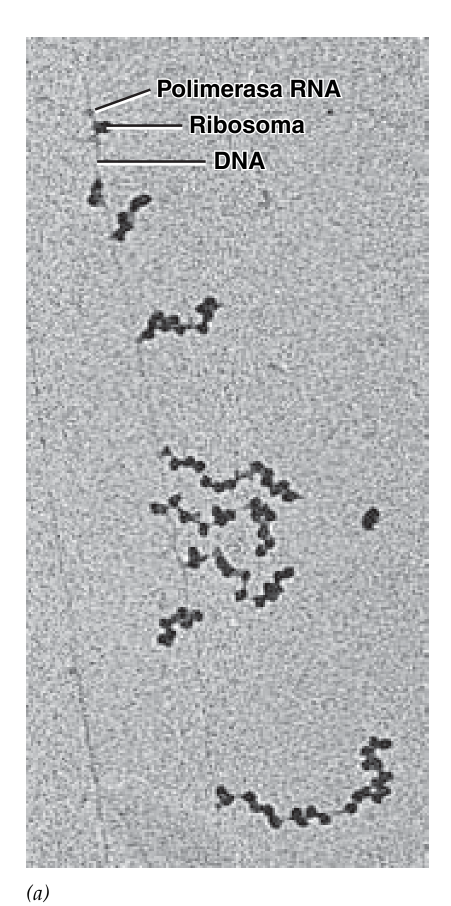
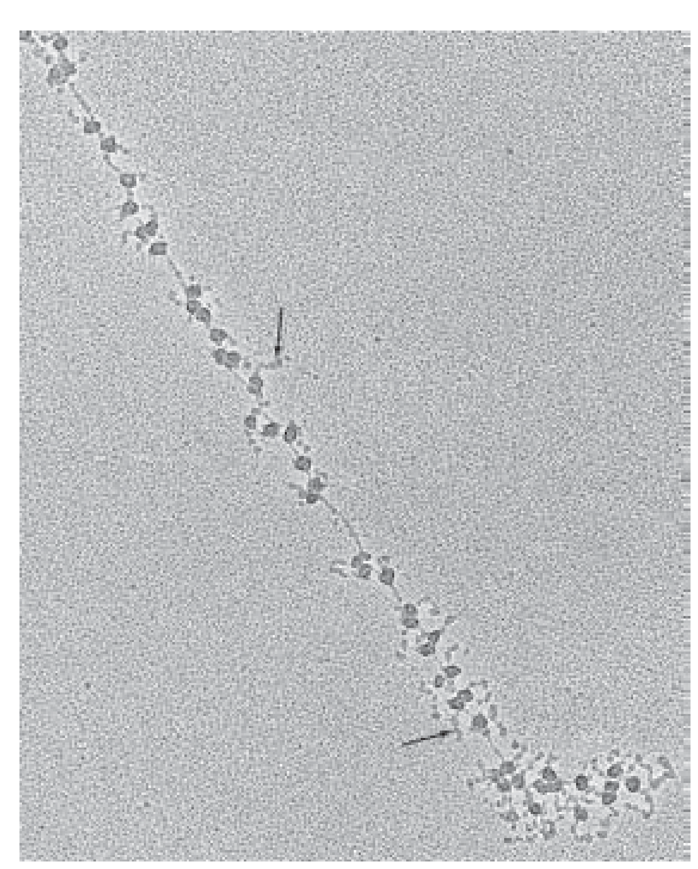


FIGURA 11-50 **Polirribosomas.** *a*) Dibujo esquemático de un polirribosoma (polisoma). *b*) Micrografía electrónica del borde exterior de una cisterna del ER rugoso. Los ribosomas están alineados en asas y espirales, lo que indica su fijación a las moléculas del mRNA para formar polisomas. *c*) Micrografía electrónica de polisomas con sombreado metálico aislados a partir de reticulocitos que sintetizan hemoglobina. La mayoría de estos polisomas tiene entre cuatro y seis ribosomas. (*B*, CORTESÍA DE E. YAMADA; *C*, CORTESÍA DE ALEXANDER RICH.)



(a)



(b)

FIGURA 11-51 Visualización de la transcripción y la traducción. *a*) Micrografía electrónica de partes de un cromosoma de *E. coli* que participa en la transcripción. El DNA se observa en la forma de líneas muy tenues que discurren a lo largo de la foto, en tanto que las cadenas del mRNA naciente se observan fijadas a uno de sus extremos, al parecer por una molécula de polimerasa de RNA. Las partículas relacionadas con los RNA nacientes son ribosomas en el momento de la traducción; en bacterias, la transcripción y la traducción ocurren de manera simultánea. Las moléculas de RNA aumentan de longitud conforme crece la distancia al sitio de inicio. *b*) Micrografía electrónica de un polirribosoma aislado de células de glándula de gusano de seda que producen gran cantidad de la proteína fibrosa de la seda. Esta proteína es lo suficientemente grande para ser visible en la micrografía (las flechas apuntan a las cadenas de los polipéptidos emergentes). (*A*, REIMPRESA CON LA AUTORIZACIÓN DE OSCAR L. MILLER, JR., BARBARA A. HAMKALO Y C. A. THOMAS, SCIENCE 169:392, 1970; © 1970, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE; *B*, CORTESÍA DE STEVEN L. MCKNIGHT Y OSCAR L. MILLER, JR.)

mRNA hasta alcanzar un codón de terminación. Tan pronto como cada ribosoma se moviliza una distancia suficiente a lo largo del mensaje a partir del codón de inicio, otro ribosoma se fija al mRNA y comienza su actividad de traducción. La rapidez con que ocurre el inicio de la traducción varía con el mRNA que se estudie; algunos mRNA tienen mucha mayor densidad de ribosomas relacionados que otros. La traducción simultánea del mismo mRNA por medio de un gran número de ribosomas incrementa en grado notorio la tasa de síntesis de proteínas dentro de la célula. Las figuras 11-50*b* y *c* muestran los polisomas eucariotas como se ven bajo microscopia electrónica. La micrografía en la figura 11-50*b* revela los polisomas unidos a la superficie citosólica de la membrana reticuloendoplásmica que intervienen en la síntesis de proteínas membranales y de organelos (pág. 286). Los polisomas que se observan en la figura 11-50*c* están libres en el citosol de un reticulocito donde sintetizan la proteína soluble hemoglobina.

Ahora que se han descrito los sucesos básicos de la traducción es necesario cerrar el capítulo con imágenes del proceso tomadas de una célula procariota (fig. 11-51*a*) y otra eucariota (fig. 11-51*b*). A diferencia de las células eucariotas, en las que la transcripción tiene lugar en el núcleo y la traducción en el citoplasma con la participación de diferentes pasos, las actividades correspondientes en células de procariotas están estrechamente acopladas. La síntesis de proteína en células bacterianas comienza en moldes de mRNA antes de que la síntesis de este mRNA concluya. La síntesis de un mRNA procede en la misma dirección conforme el movimiento de la traducción del mensaje de los ribosomas, esto es, avanza del extremo 5′ al 3′ terminal. En consecuencia, tan pronto como una molécula de RNA ha comenzado a sintetizarse, el extremo 5′ terminal está disponible para la unión de los ribosomas. La micrografía de la figura 11-51*a* muestra un DNA sometido a transcripción, los mRNA nacientes bajo síntesis y los ribosomas que traducen a cada uno de los mRNA en formación. Las cadenas de proteínas sintetizadas no se observan en la micrografía de la figura 11-51*a*, pero sí en la micrografía de la figura 11-51*b*, que muestra un solo polirribosoma aislado de una célula glandular de un gusano de

seda. La proteína de seda sometida a síntesis es visible debido a su gran tamaño y naturaleza fibrosa. El desarrollo de técnicas para visualizar la transcripción y traducción, obra de Oscar Miller, Jr., ha posibilitado una demostración visual del proceso cuya sinopsis se expresó en términos bioquímicos.

REVISIÓN ?

1. Describa algunos de los mecanismos en los cuales el paso de inicio de la traducción difiere en relación a los pasos de su elongación.
2. ¿De qué manera el efecto de una mutación de sentido equivocado difiere de la mutación de marco de lectura?, ¿por qué?
3. ¿Qué es un polirribosoma?, ¿cómo difiere su formación en procariotas y eucariotas?
4. Durante la elongación de la traducción, se puede afirmar que un aminoacil-tRNA entra en el sitio A, un peptidil-tRNA en el sitio P y un tRNA desacilado en el sitio E. Explique cómo ocurre cada uno de estos sucesos.

VÍAS EXPERIMENTALES

La función del RNA en la catálisis

La investigación en bioquímica y biología molecular durante el decenio de 1970 consolidó los conocimientos acerca de la función de las proteínas y ácidos nucleicos. Las proteínas son los agentes que activan los procesos de la célula y las enzimas las que aceleran la velocidad de las reacciones químicas dentro de los organismos. Por otra parte, los ácidos nucleicos constituyen las moléculas encargadas de la información en la célula y almacenan instrucciones genéticas en sus secuencias nucleotídicas. La división del trabajo entre proteínas y ácidos nucleicos parecía bien definida como cualquier distinción establecida en las ciencias biológicas. Entonces, en 1981, se publicó un trabajo que comenzó a diluir esta distinción.[1]

Thomas Cech y sus colaboradores de la *University of Colorado* habían estudiado el proceso mediante el cual el precursor del RNA ribosomal sintetizado por el protozoario ciliado *Tetrahymena thermophila* se convertía en moléculas de rRNA maduro. El pre-rRNA de *T. thermophila* contiene un intrón de casi 400 nucleótidos seleccionados de la transcripción primaria antes de unirse a los segmentos que deben ligarse.

Con anterioridad, Cech había observado que los núcleos aislados de las células podían sintetizar el precursor pre-rRNA y efectuar la reacción de *splicing* en su totalidad. Todavía no se aislaban enzimas de *splicing* de ningún tipo celular y *Tetrahymena* podía ser un buen sistema para estudiar dichas enzimas. El primer paso fue aislar el precursor pre-rRNA en un estado intacto y luego determinar el número mínimo de componentes nucleares que debían agregarse a la mezcla de reacción para obtener un *splicing* preciso. Se observó que al incubar núcleos aislados en un medio con cationes monovalentes en baja concentración (5 mM de NH_4^+), se sintetizaba la molécula de pre-rRNA pero el intrón no se separaba. Esto permitió a los investigadores purificar el precursor intacto, que planeaban utilizar como sustrato para ensayar la actividad de *splicing* en extractos nucleares. Sin embargo, observaron que al incubar el precursor purificado por sí solo en concentraciones más elevadas de NH_4^+ en presencia de Mg^{2+} y fosfato de guanosina (p. ej., GMP o GTP), el intrón se eliminó del precursor (fig. 1).[1] El análisis de la secuencia nucleotídica confirmó que el RNA pequeño separado del precursor era el intrón con un nucleótido añadido que contenía guanina en el extremo 5′. Se demostró que el nucleótido adicional se deriva del GTP agregado a la mezcla de reacción.

El *splicing* de un intrón es una reacción compleja que requiere el reconocimiento de las secuencias que limitan el intrón, la rotura de los enlaces fosfodiéster en ambos extremos del intrón y la unión de los fragmentos adyacentes. Se ha hecho todo tipo de esfuerzos para eliminar cualquier proteína que pueda adherirse al RNA antes de probar su capacidad para realizar el *splicing*. El RNA se ha extraído con detergente y fenol, se ha centrifugado a través de un gradiente y se ha tratado con una enzima proteolítica. Sólo hubo dos explicaciones razonables: el mecanismo de *splicing* lo efectuaba una proteína unida firmemente al RNA o la molécula de pre-rRNA era capaz de sufrir *splicing* por sí misma. Esta última idea no era fácil de aceptar.

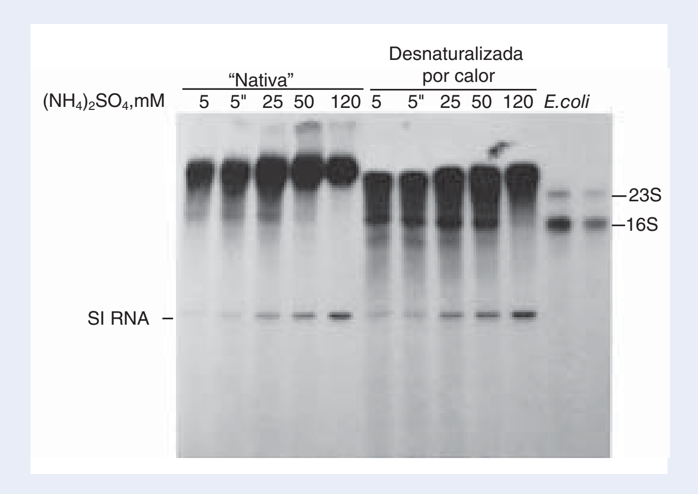


FIGURA 1 RNA ribosomal purificado de *Tetrahymena* marcado con ^{32}P, transcrito en concentraciones diferentes de $(NH_4)_2SO_4$ y analizado por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida. Los números en la parte superior indican la concentración de sulfato de amonio. Se presentan dos grupos de muestras, “la forma nativa” y la forma desnaturalizada por calor. Las muestras del último grupo se sometieron a ebullición por cinco minutos en amortiguador y se incubaron en hielo para disociar cualquier molécula que se mantuviera unida con puentes de hidrógeno entre las bases complementarias. Las dos columnas de la derecha contienen rRNA bacterianos 16S y 23S, que proveen los marcadores de tamaño conocido con los cuales se pueden comparar las otras bandas en el gel. Puede observarse a partir de las posiciones de las bandas que a medida que la concentración de sulfato de amonio aumenta, aparecen los RNA pequeños cuyo tamaño es igual a los intrones aislados (SI, secuencia interpuesta). Estos datos suministran la primera indicación de que el rRNA es capaz de cortar el intrón sin la ayuda de otros factores adicionales. (TOMADA DE T. R. CECH ET AL., CELL 27:488, 1981; CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS.)

Para resolver el problema de la presencia de una proteína contaminante, Cech y sus colaboradores recurrieron a un sistema artificial que no tenía la posibilidad de contener proteínas nucleares de *splicing*.[2] El DNA que codifica al precursor de rRNA se obtuvo a partir de *E. coli* y se purificó y utilizó como molde para la transcripción in vitro una polimerasa de RNA bacteriana purificada. El pre-rRNA sintetizado in vitro se purificó e incubó por sí solo en presencia de iones monovalentes y divalentes y un compuesto de guanosina. Puesto que el RNA nunca había estado en una célula, era imposible que estuviera contaminado por enzimas celulares de *splicing*. Aun así, el pre-rRNA aislado sufrió la reacción de *splicing* tal y como había ocurrido en la célula. El RNA tenía que experimentar *splicing* por sí solo.

Como resultado de estos experimentos, el RNA mostró ser capaz de catalizar una reacción compleja de múltiples pasos. Los cálculos indicaron que esta reacción se había acelerado a una velocidad cercana a 10 000 millones de veces mayor en comparación con la reacción no catalizada. Por lo tanto, al igual que las enzimas proteínicas, el RNA pudo acelerar de modo considerable una reacción química. La principal diferencia entre este RNA y las "enzimas proteínicas estándar" fue que el RNA actúa sobre sí mismo en lugar de hacerlo sobre un sustrato independiente. Cech denominó al RNA "ribozima".

En 1983 se descubrió un segundo ejemplo de la catálisis de RNA.[3] Sidney Altman de la *Yale University* y Norman Pace del *National Jewish Hospital* en Denver eran colaboradores en el estudio de la ribonucleasa P, una enzima que interviene en el procesamiento de un RNA de transferencia y es precursora en bacterias. La enzima era poco común dado que se componía de proteínas y RNA. Cuando se incubó en amortiguadores con una concentración elevada de Mg^{2+} (60 mM), la subunidad de RNA purificada pudo eliminar el extremo 5′ del precursor del tRNA (línea 7, fig. 2), del mismo modo que la molécula íntegra de la ribonucleasa P lo haría dentro de la célula. Los productos de la reacción in vitro incluyen la molécula de tRNA madura procesada. Por el contrario, la subunidad de proteína aislada de la enzima no tenía actividad catalítica (línea 5, fig. 2).

Para eliminar la posibilidad de que una proteína contaminante fuera en verdad la que catalizaba la reacción, se sintetizó in vitro la porción de RNA de la ribonucleasa P a partir de un DNA recombinante molde. Tal y como se observó con el RNA extraído de las células bacterianas, este RNA sintetizado de forma artificial, sin proteína alguna añadida, pudo cortar con precisión al precursor del tRNA.[4] A diferencia de la enzima procesadora de rRNA estudiada por Cech, el RNA de la ribonucleasa P actúa sobre otra molécula como sustrato y no sobre sí misma. Por lo tanto, se demostró que las ribozimas pueden tener las mismas propiedades catalíticas que las enzimas proteicas. En la figura 3 se muestran un modelo de la interacción entre la subunidad catalítica de RNA de la ribonucleasa P y un precursor del sustrato de tRNA.

La demostración que el RNA podía catalizar reacciones químicas suscitó una atmósfera apropiada para reformular una pregunta añeja: ¿qué componente de la subunidad ribosómica grande es la transferasa de peptidilo, es decir, el catalizador de la formación de los enlaces peptídicos? Durante la década de 1970, diferentes hallazgos independientes plantearon la posibilidad de que el RNA ribosomal podía efectuar algo más que tan sólo actuar como un molde o andamiaje para mantener las proteínas ribosómicas en la posición adecuada para catalizar la traducción. Entre los hallazgos se incluyeron los siguientes tipos de datos:

1. Ciertas cepas de *E. coli* portan genes que codifican proteínas que destruyen bacterias y se conocen como colicinas. Se sabe que una de estas toxinas, la colicina E3, inhibe la síntesis de proteínas en células bacterianas sensibles. Los ribosomas aislados de células tratadas con colicina E3 parecen del todo normales, de acuerdo con la mayor parte de los criterios, pero no sostienen la síntesis de proteínas in vitro. Un análisis más detallado de estos ribosomas reveló que el defecto residía en el rRNA, no en las proteínas ribosomales.

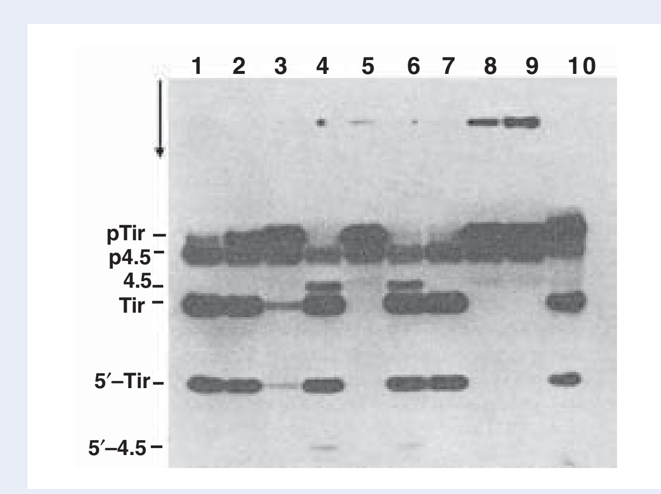


FIGURA 2 Resultados de la electroforesis en geles de poliacrilamida de las mezclas de reacción que contenían el precursor del tirosinil-tRNA (pTir) y el precursor de otro RNA llamado RNA 4.5S (p4.5). Se describe sólo el pTir, que se procesa por lo general mediante la ribonucleasa P en dos moléculas de RNA, Tir y 5′-Tir (que es el extremo 5′ terminal del precursor). Las posiciones en las cuales estos tres RNA (pTir, Tir y 5′-Tir) migran durante la electroforesis se indican en el lado izquierdo del gel. La línea 1 muestra los RNA que aparecen en la mezcla de reacción cuando pTir (y p4.5) se incuba con la ribonucleasa P completa. Muy poco del pTir permanece en la mezcla y se transforma en dos productos (Tir y 5′-Tir). La línea 5 señala los RNA que aparecen en la mezcla de reacción cuando pTir se incuba con el componente proteínico purificado de la ribonucleasa P. La proteína no corta al precursor del tRNA, como es evidente, por la ausencia de bandas en las que los dos productos deberían migrar. En cambio, cuando pTir se incuba con el componente del RNA purificado de la ribonucleasa P (línea 7), el pTir se procesa de manera eficiente como al utilizar la ribonucleoproteína intacta. (Tomada de Cecilia Guerrier-Tokada et al. Cell 35:850, 1983; con autorización de Cell Press.)

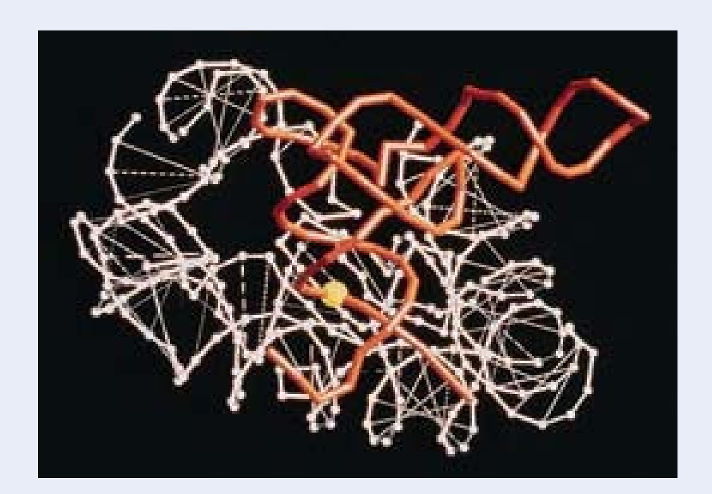


FIGURA 3 Un modelo molecular de una porción de la subunidad RNA catalítica de la ribonucleasa P bacteriana (en blanco) y su sustrato unido, el tRNA precursor (en rojo). El sitio del tRNA precursor, donde lo corta la ribozima, se indica con una esfera en amarillo. (Cortesía de Michael E. Harris y Norman R. Pace.)

La colicina cortó el RNA 16S de la subunidad pequeña en casi 50 nucleótidos desde su extremo 3′ y esta es la causa de que la subunidad completa no apoyara la síntesis de proteínas.[5]

2. El tratamiento de las subunidades grandes ribosomales con ribonucleasa T_1, una enzima que corta las uniones entre los nucleótidos accesibles de RNA, destruye la capacidad de la subunidad para efectuar la reacción de la transferasa de peptidilo.[6]
3. Diferentes estudios con antibióticos que inhiben la formación de enlaces peptídicos, incluidos el cloranfenicol, carbomicina y eritromicina, sugieren que estos fármacos actúan sobre el RNA ribosomal, no en la proteína. Por ejemplo, se encontró que los ribosomas se vuelven resistentes a los efectos del cloranfenicol como resultado de sustituciones en las bases del RNA ribosomal.[7]
4. Se ha demostrado que los RNA ribosomales tienen secuencias de bases muy conservadas, mucho más que las secuencias aminoacídicas de las proteínas ribosomales. Algunas de las regiones de los RNA ribosomales virtualmente no cambian en ribosomas aislados de procariotas, plantas y animales, al igual que en ribosomas aislados de mitocondrias y cloroplastos. El hecho de que las secuencias de rRNA estén muy conservadas sugiere que las moléculas tienen una función crucial en la función del ribosoma.[8,9] De hecho, en una publicación de 1975, C. R. Woese y colaboradores señalaron lo siguiente: "Puesto que la correlación entre estas regiones conservadas y los sitios conocidos de unión de proteínas ribosomales es escasa o no existe, hay una fuerte implicación de que las grandes regiones del RNA participen de forma directa en la función ribosomal".[8]

Después del descubrimiento del RNA catalítico en los laboratorios de Cech y Altman, se intensificó la investigación sobre el papel del RNA ribosomal. Los estudios que llevaron a cabo Harry Noller y sus colegas de la *University of California*, en Santa Cruz, precisaron que el sitio en el RNA ribosomal reside en o alrededor del centro de la transferasa de peptidilo. En un estudio se mostró que los RNA de transferencia, unidos al ribosoma protegen a las bases específicas en el rRNA de la subunidad grande del ataque de agentes químicos específicos. La protección del ataque químico es evidencia de que el tRNA debe estar situado muy cerca de las bases del rRNA que se encuentran protegidas.[10] La protección se pierde si el extremo 3′ del tRNA (el extremo con el CCA unido al aminoácido) se elimina. Éste es el extremo del tRNA que participa en la formación del enlace peptídico, del cual cabría esperar que residiera muy cerca del sitio de la transferasa de peptidilo.

Los intentos de asignar una función particular al RNA ribosomal *aislado* han fallado. Se considera que aun si el RNA ribosomal carece de función específica, la presencia de proteínas ribosomales es por lo menos necesaria para mantener el rRNA en su conformación apropiada. Al considerar que las proteínas ribosomales y el rRNA evolucionaron de forma conjunta durante miles de millones de años, sería de esperar que las dos moléculas dependieran la una de la otra. A pesar de esta expectativa, en 1992, Noller y sus colaboradores demostraron por fin la capacidad catalítica del rRNA aislado.[11] Al trabajar con ribosomas particularmente estables de *Thermus aquaticus*, una bacteria que vive a temperaturas elevadas, Noller trató preparaciones de la subunidad ribosomal grande con un detergente para obtener proteína (SDS), una enzima que degrada proteínas (proteinasa K) y varios lavados con fenol, un desnaturalizante de proteínas. Juntos, estos agentes removieron al menos 95% de las proteínas de la subunidad ribosomal y separaron al rRNA. La mayor parte del 5% de la proteína vinculada con el rRNA consistía en pequeños fragmentos de proteínas ribosomales. A pesar de la remoción de casi todas las proteínas, el rRNA retuvo la actividad de la transferasa de peptidilo en 80% de la subunidad intacta. El cloranfenicol y el tratamiento con ribonucleasa bloquearon la actividad catalítica. Cuando el RNA se sometió a tratamientos adicionales para remover la cantidad pequeña de proteína remanente, la preparación perdió su actividad catalítica. Debido a que es muy raro que la proteína remanente tenga cualquier actividad catalítica de importancia, se presume por estos experimentos que la transferasa de peptidilo es una ribozima.

Esta conclusión ganó confirmación por los estudios de cristalografía de rayos X que realizaron Thomas Steitz, Peter Moore y sus colaboradores de la *Yale University* sobre la subunidad ribosomal grande de *Haloarcula marismortui*, una arqueobacteria que vive en el mar Muerto. Un modelo de esta subunidad se muestra en la imagen inicial del capítulo en la página 429. Para identificar el sitio de la transferasa de peptidilo dentro de la subunidad ribosomal grande, estos investigadores sometieron los cristales de estas subunidades a la acción de CCdA-puromicina-fosfato, una sustancia que inhibe la formación del enlace peptídico por medio de la unión al sitio activo de la transferasa de peptidilo.

La determinación de la estructura de estas subunidades por resolución atómica reveló la localización de la unión del inhibidor y de esa forma la localización del sitio de la transferasa de peptidilo.[12] En este estudio se encontró que el sitio activo del inhibidor se une dentro de una hendidura de la subunidad que está rodeada enteramente por residuos nucleotídicos conservados del 23S rRNA. De hecho, no existe ninguna cadena lateral de aminoácidos de las proteínas ribosomales en alrededor de 18 Å del sitio donde se sintetiza un enlace peptídico. Esto apoya de manera relevante la conclusión de que el ribosoma es una ribozima.

Referencias

1. Cech, T. R., Zaug, A. J., & Grabowski, P. J. 1981. In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena. Cell* 27:487–496.
2. Kruger, K., et al. 1982. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena. Cell* 31:147–157.
3. Guerrier-Tokada, C., et al. 1983. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35:849–857.
4. Guerrier-Tokada, C., et al. 1984. Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription in vitro. *Science* 223:285–286.
5. Bowman, C. M., et al. 1971. Specific inactivation of 16S ribosomal RNA produced by colicin E3 in vivo. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA.* 68:964–968.
6. Cerna, J., Rychlik, I., & Jonak, J. 1975. Peptidyl transferase activity of *Escherichia coli* ribosomes digested by ribonuclease T_1. *Eur. J. Biochem.* 34:551–556.
7. Kearsey, S. & Craig, I. W. 1981. Altered ribosomal RNA genes in mitochondria from mammalian cells with chloramphenicol resistance. *Nature* 290:607–608.
8. Woese, C. R., et al. 1975. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature* 254:83–86.
9. Noller, H. F. & Woese, C. R. 1981. Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science* 212:403–411.
10. Moazed, D. & Noller, H. F. 1989. Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites. *Cell* 57:585–597.
11. Noller, H. F., Hoffarth, V., & Zimniak, L. 1992. Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* 256:1416–1419.
12. Nissen, P., et al. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289:920–930.

SINOPSIS

La comprensión de la relación entre los genes y las proteínas es resultado de algunas observaciones clave. La primera observación importante se debe a Garrod, quien aseguró que las personas que sufren enfermedades metabólicas hereditarias carecen de enzimas específicas. Más adelante, Beadle y Tatum indujeron mutaciones en los genes de *Neurospora* e identificaron las reacciones metabólicas específicas afectadas. Estos estudios condujeron al concepto de "un gen-una enzima" y más adelante a la versión más depurada de "un gen-una cadena polipeptídica". Ingram describió por primera vez las consecuencias moleculares de una mutación y demostró que la anemia de células falciformes, una enfermedad hereditaria, se debía a la sustitución de un solo aminoácido en una cadena de globina (pág. 430).

El primer paso en la expresión de un gen es la transcripción de una cadena de la plantilla de DNA que efectúa una polimerasa de RNA. Las moléculas de la polimerasa se dirigen al sitio apropiado sobre el DNA al unirse a una región promotora, que en casi todos los casos se halla justo por delante del sitio en que se inicia la transcripción. La polimerasa se desplaza en sentido 3′ a 5′ a lo largo de la cadena de DNA que sirve como molde y ensambla una cadena complementaria y antiparalela de RNA que se proyecta desde su extremo terminal 5′ en dirección 3′. A cada paso a lo largo de la cadena, la enzima cataliza una reacción en la cual se hidrolizan los trifosfatos de ribonucleósido (NTP) para transformarse en monofosfatos de nucleósido conforme se incorporan. La reacción también se controla por hidrólisis del pirofosfato liberado. Los procariotas poseen un solo tipo de polimerasa de RNA que puede relacionarse con varios factores sigma diferentes, que determinan qué genes se transcriben. El sitio donde se inicia la transcripción se establece por una secuencia de nucleótidos localizada unas 10 bases por delante del sitio de inicio (pág. 432).

Las células eucariotas tienen tres distintas polimerasas de RNA (I, II y III), cada una encargada de la síntesis de diferentes grupos de RNA. Alrededor de 80% de las células de RNA se conforma con RNA ribosomal (rRNA). La polimerasa de RNA I sintetiza los RNA ribosomales (con excepción de las especies 5S); la polimerasa de RNA III la transferencia de RNA y rRNA 5S, y la polimerasa de RNA II el mRNA. Los tres tipos de RNA derivan de transcripciones primarias que son más largas que el producto final de RNA. El procesamiento del RNA requiere una gran variedad de RNA nucleares pequeños (snRNA) (pág. 436).

Tres de los cuatro rRNA eucariotas (5.8S, 18S y 28S) se sintetizan a partir de una sola unidad de transcripción, constituida por DNA (rDNA) y localizada dentro del nucleolo, y se procesa mediante una serie de reacciones nucleolares. Los nucleolos de oocitos de anfibios se pueden lisar para revelar el rDNA activo en transcripción, que toma la forma de una cadena de "árbol de Navidad". Cada uno de los árboles es una unidad de transcripción, cuyas ramas pequeñas representan a RNA cortos que están en un periodo temprano de transcripción, esto es, muy cercanos al sitio donde se inició la síntesis de RNA. Los análisis de estos complejos muestran ordenamientos en tándem de los genes de rRNA, espaciadores no transcritos que separan las unidades de transcripción y ribonucleoproteínas relacionadas (RNP), partículas que intervienen en el procesamiento de las transcripciones. Se han estudiado los pasos en el procesamiento del rRNA al exponer a células de cultivo de mamíferos a precursores marcados, como [^{14}C]metionina, cuyos grupos metilo se transfieren a diferentes nucleótidos de pre-rRNA. La presencia de grupos metilo protege al parecer a ciertos sitios en el RNA del corte por nucleasas y contribuye al plegamiento de la molécula de RNA. Cerca de la mitad de las transcripciones primarias 45S se elimina durante el curso de la formación de los productos de los tres rRNA maduros. El nucleolo es también el sitio de ensamble de dos subunidades ribosomales (pág. 437).

Estudios de cinética de RNA marcados con rapidez sugirieron primero que los mRNA procedían de precursores mucho más grandes. Cuando se incubaban células eucariotas, de uno a pocos minutos en uridina marcada con ^{3}H, u otros precursores de RNA marcados, la mayor parte del marcador se incorpora al grupo de moléculas de RNA de peso molecular muy elevado y diversas secuencias de nucleótidos y se restringe en el núcleo. Este RNA se conoce como RNA nuclear heterogéneo (o hnRNA). Cuando las células incubadas por un breve lapso con [^{3}H]uridina se siguen en un medio con precursores no marcados durante una hora o más, la radiactividad aparece en el mRNA citoplásmico más pequeño. Este y otros datos, como la presencia de capuchones 5′ y colas poli(A) 3′ en hnRNA y mRNA, llevó a concluir que el hnRNA es el precursor del mRNA (pág. 444).

Los pre-mRNA se sintetizan por acción de la polimerasa de RNA II junto con algunos factores de transcripción general que permiten a la polimerasa reconocer el sitio de DNA apropiado e iniciar la transcripción en el nucleótido adecuado. En muchos genes, el promotor se sitúa entre las bases 24 y 32 por delante del sitio de inicio en una región que contiene la secuencia TATA. Esta caja TATA la identifica la proteína de unión a la caja TATA (TBP), cuya unión al DNA inicia el ensamble de un complejo de preinicio. La fosforilación de una porción de la polimerasa de RNA lleva a la separación de la polimerasa y al comienzo de la transcripción (pág. 445).

Una de las revisiones más importantes del concepto de gen se llevó a cabo a fines del decenio de 1970 tras descubrir que las regiones codificantes de un gen no forman una secuencia continua de nucleótidos. Las primeras observaciones a este respecto se efectuaron en estudios de transcripción en el genoma del adenovirus en el cual se encontró que la porción terminal de un número diferente de RNA mensajeros se compone de la misma secuencia de nucleótidos que codifican varios segmentos discontinuos en el DNA. Las regiones entre los segmentos codificantes se conocen como secuencias de interferencia o intrones. Una condición semejante se identificó pronto en los genes celulares, como los que codifican a la globina beta y la ovoalbúmina. En este caso, las regiones del DNA que codifican porciones del polipéptido (exones) se separan la una de la otra por regiones no codificantes (intrones). Análisis posteriores indicaron que el gen se transcribe en su totalidad como transcripción primaria. Las regiones correspondientes a los intrones se eliminan después del pre-mRNA y los extremos codificantes adyacentes se ligan a su vez. Este proceso de eliminación y ligación se conoce como *splicing* de RNA (pág. 447).

Los principales pasos en el procesamiento de las transcripciones primarias en mRNA incluyen la adición de un capuchón 5′, la formación de un 3′ terminal, la adición de una cola de 3′ poli(A) y la eliminación de intrones. La formación del casquete 5′ ocurre por reacciones secuenciales en las cuales se elimina el fosfato terminal, un GMP se une en una orientación invertida y los grupos metilo se transfieren a la guanosina y el primer nucleótido de la propia transcripción. El extremo 3′ terminal del mRNA se genera por desdoblamiento de la transcripción primaria justo en el sitio situado por debajo de un punto de reconocimiento AAUAAA y la adición de residuos de adenosina, uno a la vez, mediante la polimerasa poli(A). La eliminación de los intrones de la transcripción primaria depende de la presencia de residuos invariables en ambos sitios del empalme 5′ y 3′ sobre cualquier lado de cada intrón. El *splicing* se efectúa por medio de un espliceosoma que contiene varias proteínas y partículas ribonucleoproteicas (snRNP)

que se ensamblan de forma gradual en el sitio donde se retira el intrón. Los estudios sugieren que los snRNA de los espliceosomas, no las proteínas, son los componentes activos de los snRNP desde el punto de vista catalítico. Uno de los beneficios aparentes del corte de genes es la facilidad con la cual los exones pueden intercambiarse dentro del genoma y generar nuevos genes a partir de porciones de los preexistentes (pág. 450).

La mayor parte de las células eucariotas tiene un mecanismo llamado RNA de interferencia inducido por RNA de doble cadena que lleva a la destrucción de los mRNA complementarios. El RNA de interferencia ha evolucionado al parecer como mecanismo de defensa contra la infección vírica o la movilidad de los transposones. Los investigadores han tomado ventaja de este fenómeno como una herramienta para detener la síntesis de proteínas específicas al utilizar como blancos sus mRNA. Los genomas eucariotas codifican gran número de pequeños micro-RNA (miRNA) (20 a 25 nucleótidos) que regulan la traducción de mRNA específicos y tal vez tienen otras múltiples funciones Tanto siRNA como miRNA son generados por una maquinaria de procesamiento que incluye la enzima Dicer, la cual escinde el precursor, y un complejo efector RISC, que sostiene la guía de RNA monocatenario que corta el mRNA o bloquea su traducción (pág. 459).

La información para la incorporación de aminoácidos en un polipéptido se codifica en la secuencia de tripletes de codones del mRNA. Además de encontrarse en el triplete, el código genético no está superpuesto y es del tipo degenerado. En un código no superpuesto, cada nucleótido es parte de un codón, y sólo de uno, y el ribosoma debe moverse a lo largo del mensaje tres nucleótidos a la vez. El ribosoma se une al mRNA en el codón de inicio, AUG, el cual pone automáticamente al ribosoma en un marco de lectura adecuado para que lea de modo correcto el mensaje por entero. El código de tripletes construido de cuatro diferentes nucleótidos puede tener 64 (4^3) codones diferentes. El código es degenerado debido a que muchos de sus 20 aminoácidos diferentes tienen más de un codón. De los 64 posibles codones, 61 especifican a un aminoácido, mientras que los otros tres son codones de terminación que llevan al ribosoma a concluir la traducción. La asignación de codones es en esencia universal y sus secuencias son tales que la sustitución de bases en el mRNA tiende a reducir al mínimo el efecto sobre las propiedades del polipéptido (pág. 464).

El RNA de transferencia codifica la información del alfabeto nucleotídico del DNA y RNA durante el procesamiento de la traducción. Los RNA de transferencia son pequeños RNA (73 a 93 nucleótidos de longitud) que muestran similitud, forma de L, estructura tridimensional y un número de residuos invariables. Un extremo del tRNA porta el aminoácido y el otro extremo contiene una secuencia anticodón de tres nucleótidos que es complementaria del codón triplete del mRNA. Los requerimientos estéricos de complementariedad entre el codón y el anticodón disminuyen en la tercera posición del codón para permitir diferentes codones que codifican el mismo aminoácido para usar el mismo tRNA. Es esencial que cada tRNA se una a un aminoácido propio (específico), es decir, el aminoácido codificado por el codón de mRNA para el cual el anticodón de tRNA se une. La unión del tRNA a su propio aminoácido la lleva a cabo un grupo de enzimas conocidas como sintetasas de aminoacil-tRNA. Cada enzima es específica para uno de los 20 aminoácidos y es capaz de reconocer todos los tRNA para los cuales el aminoácido debe unirse. La formación de la aminoacil-tRNA es el paso primario de requerimiento de energía en el proceso entero del ensamble de polipéptidos (pág. 467).

La síntesis de proteínas es una actividad sintética compleja que incluye a todos los diferentes tRNA con sus aminoácidos a los cuales se unen los ribosomas, el RNA mensajero, varias proteínas, los cationes y GTP. El proceso se divide en tres actividades: inicio, elongación y terminación. Las actividades principales del inicio incluyen la unión precisa de la subunidad ribosomal pequeña al codón de inicio del mRNA, que establece el marco de lectura para todo el proceso de traducción; la entrada al ribosoma del tRNA iniciador especial, y el ensamblado del mecanismo de traducción. Durante la elongación ocurre un ciclo de entrada del tRNA, formación del enlace peptídico y la salida del tRNA que inicia otro ciclo con cada aminoácido incorporado. El aminoacil tRNA penetra en el sitio A, donde se une al codón complementario del mRNA. Conforme entra cada tRNA, el polipéptido emergente fijado al tRNA del sitio P se transfiere al aminoácido sobre el tRNA del sitio A y forma un enlace peptídico. Una porción del rRNA grande que actúa como ribozima cataliza la formación de enlaces peptídicos. En el último paso de la elongación, el ribosoma se transloca al siguiente codón del mRNA, a medida que el tRNA desacilado del sitio P se transfiere al sitio E, y el tRNA desacilado que estaba en el sitio E se libera desde el ribosoma. El inicio y la elongación requieren la hidrólisis de GTP. La traducción termina cuando el ribosoma alcanza uno de los tres codones de detención. Después que un ribosoma se ensambla en el codón de inicio y se desplaza una corta distancia hacia el extremo 3′ del mRNA, casi siempre otro ribosoma se fija al codón de inicio, de tal modo que varios ribosomas traducen cada mRNA de manera simultánea, lo que incrementa en buena medida la tasa de síntesis de proteína dentro de la célula. El complejo formado por un mRNA y sus ribosomas acompañantes constituye un polirribosoma (pág. 470).

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. Al observar la carta de codones de la figura 11-41, ¿cuáles cabría esperar que tuvieran un tRNA único, es decir, un tRNA que sólo utiliza un codón?, ¿por qué muchos codones carecen de su propio tRNA único?
2. La proflavina es un compuesto que se inserta por sí mismo dentro del DNA y causa mutaciones de marco de lectura (pág. 475). ¿De qué forma el efecto sobre la secuencia aminoacídica de una mutación inducida por flavina difiere entre un código superpuesto y uno no superpuesto?
3. Se ha aislado un nuevo fármaco que sólo tiene un efecto en el metabolismo celular; este agente inhibe por completo la eliminación de pre-rRNA al RNA ribosomal. Después de tratar un cultivo de células de mamífero con este fármaco se suministra a las células [^{3}H]uridina por dos minutos y entonces crecen las células en presencia del medicamento en un medio no marcado por cuatro horas antes de extraer el RNA y centrifugarlo a través de un gradiente de sacarosa. Dibuje las curvas que se obtendrían tras registrar la absorbancia a 260 nm y la radiactividad contra la fracción obtenida del gradiente. Marque la abscisa (eje X) con valores de S del RNA.
4. Con base en el mismo eje de la pregunta anterior, trace el perfil del RNA radiactivo que debería obtener después de incubar un cultivo de las células de mamífero por 48 h en [^{3}H]uridina sin ningún fármaco inhibidor.
5. Asúmase que se elabora un RNA sintético a partir de un dinucleótido repetitivo (p. ej., AGAGAGAG) y luego se utiliza este RNA como mensajero para sintetizar un polipéptido en un sistema sintetizador de proteínas in vitro, como el que emplearon Nirenberg y Matthaei para producir polifenilalalanina. ¿Qué tipo de polipéptido esperaría producir a partir de este polinucleótido en particular?,

¿esperaría tener más de un tipo de polipéptido producido?, ¿por qué?

6. Si hallara una enzima que se incorporara al azar en nucleótidos dentro de un polímero sin el requerimiento de un molde, ¿cuántos codones diferentes podría encontrar en un RNA sintético elaborado con dos distintos precursores de nucleótidos (p. ej., CTP y ATP)? (Una enzima denominada fosforilasa de polinucleótido cataliza este tipo de reacción y se empleó en estudios para identificar codones.)
7. Dibuje las partes de una globina 15S pre-mRNA y marque las posiciones no codificantes.
8. ¿Cuál es el menor número de GTP necesario para sintetizar un pentapéptido?
9. En los mismos ejes de la figura 10-17, trace dos curvas de renaturalización, una para el DNA extraído del tejido cerebral de *Xenopus* y otra para el DNA extraído de oocitos de *Xenopus*.
10. ¿Estaría de acuerdo con la siguiente afirmación: El descubrimiento de que la anemia de células falciformes es resultado del cambio de un solo aminoácido demuestra que el código genético no está superpuesto? ¿Por qué?
11. La talasemia es una enfermedad caracterizada por mutaciones que convierten codones de aminoácidos en codones de terminación. Supóngase que debe comparar los polipéptidos sintetizados in vitro a partir del mRNA purificado de una gran variedad de pacientes con talasemia. ¿Cómo esperaría comparar estos polipéptidos? Observe la carta de codones de la figura 11-41; ¿cuántos codones de aminoácidos pueden convertirse en codones de detención al sustituir una sola base?
12. ¿Piensa usted que sería teóricamente posible obtener un código genético con sólo dos letras, A y T? Si es así, ¿cual sería el menor número de nucleótidos requeridos para elaborar un codón?
13. En la página 458 se describen los experimentos que llevaron a la síntesis de ribozimas con actividad catalítica única. En el año 2001, una ribozima artificial que se aisló fue capaz de incorporar más de 14 ribonucleótidos en el extremo de un RNA existente al usar una cadena de RNA como molde. La ribozima puede emplearse en cualquier secuencia de RNA como molde y podría incorporar nucleótidos complementarios en una cadena nuevamente sintetizada de RNA con una precisión de 98.5%. Si usted fuera un defensor del mundo del RNA antiguo, ¿cómo debería usar este hallazgo para apoyar su caso?, ¿prueba esto la existencia de un mundo de RNA antiguo? Si es así, ¿qué proveería la evidencia más sólida de la existencia de dicho mundo?
14. ¿Cómo es posible que la síntesis de mRNA ocurra a una mayor tasa en las células bacterianas que en cualquier otro tipo, aunque muy poco mRNA se encuentre dentro de la célula?
15. Si un codón para serina es 5′-AGC-3′, el anticodón para este triplete sería 5′- — — — -3′. ¿Cómo afectaría el fenómeno de bamboleo a esta interacción codón-anticodón?
16. Uno de los principales argumentos esgrimidos para asegurar que las proteínas evolucionaron antes que el DNA (es decir, el mundo del RNA evolucionó en un mundo de RNA-proteína, no tanto en un mundo de RNA-DNA) se basa en el hecho de que la maquinaria de la traducción incluye una gran variedad de RNA (p. ej., los tRNA, rRNA), en la que la maquinaria de transcripción no muestra evidencia de la participación del RNA. ¿Podría explicar cómo tal argumento acerca de los estados de evolución temprana debe basarse en estas observaciones?
17. Las mutaciones en el marco de lectura y mutaciones sin sentido se describieron en la página 475. Se observó que las mutaciones sin sentido llevan a menudo a la destrucción por NMD de un mRNA que contiene un codón de terminación prematuro. ¿Esperaría que el mRNA contenga mutaciones en el marco de lectura para someterse a NMD?
18. Las puntas de flecha en la figura 11-16 indican la dirección de la transcripción de varios genes de tRNA. ¿Qué le dice este dibujo acerca de la actividad de los moldes de cada cadena de una molécula de DNA dentro de un cromosoma?
19. Los genes se descubrieron casi siempre por hallazgos de un fenotipo anormal resultante de una mutación genética. De manera alternativa, pueden reconocerse por examen de secuencias de DNA de un genoma. ¿Por qué se supone que los genes que codifican a los miRNA no se descubrieron hasta fecha muy reciente?
20. En la página 465 se dijo que los cambios de codones sinónimos *por lo general* no alteran el fenotipo de un organismo. ¿Se le ocurre un caso en que esto pudiera no cumplirse? (Sugerencia: puede consultar la figura 11-30.)

SITIO EN INTERNET www.wiley.com/college/karp

Las animaciones y los videos indicados en este capítulo pueden visitarse en el sitio de Cell and Molecular Biology de Karp en Internet. También hallará todas las respuestas a las preguntas analíticas recién planteadas, autoexámenes que le ayudarán a prepararse para los exámenes, y vínculos con fascinantes recursos. La sección lecturas adicionales que sigue se amplía en el sitio en Internet.

LECTURAS ADICIONALES

Ambros, V. & Ruvkun, G., et al. 2004. Historical perspectives on miRNA discovery. *Cell* S116:S89–S96.

Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281–297.

Black, D. L. 2005. A simple answer for a splicing conundrum. *PNAS* 102:4927–4928. [reconocimiento del sitio de empalme.]

Carthew, R. W. 2006. Gene regulation by microRNAs. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 16:203–208.

Carthew, R. W. 2006. A new RNA dimension to genome control. *Science* 313:305–306.

Cramer, P. 2004. RNA polymerase II structure: from core to functional complexes. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 14:218–226.

Crick, F. H. C. 1966. The genetic code III. *Sci. Am.* 215:55–62. (Oct.).

Cristofaro, P. & Ramratnam, B. 2006. RNAi tackles a sexually transmitted disease. *Nature Biotech.* 24:48–49.

Dykxhoorn, D. M. & Lieberman, J. 2006. Knocking down disease with siRNAs. *Cell* 126:231–235.

Eccleston, A., et al. 2005. “Nature Milestones in Gene Expression. *Nature* Suppl. to December issue. [sobre descubrimientos fundamentales.]

Filipowicz, W. 2005. RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell* 122:17–20.

Freeland, S. J. & Hurst, L. D. 2004. Evolution encoded. *Sci. Amer.* pp. 84–91. April.

Fu, X.-D. 2004. Towards a splicing code. *Cell* 119:736–738.

Greive, S. J. & von Hippel, P. H. 2005. Thinking quantitatively about transcriptional regulation. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 6:221–232.

Guthrie, C. & Steitz, J., eds. 2005. Nucleus and gene expression: coordinated nuclear events regulate mRNA synthesis, processing, export and turnover. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:#3.

Hahn, S. 2004. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nature Struct. Mol. Biol.* 11:394–403.

Joyce, G. F. 2002. The antiquity of RNA-based evolution. *Nature* 418:214–221.

Judson, H. F. 1996. The Eighth Day of Creation. CSHL Press. [perspectiva histórica de los primeros estudios en biología molecular.]

Khorana, H. G. 1966. Polynucleotide synthesis and the genetic code. *Harvey Lects.* 62:79–106.

Kim, V. N. 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6:376–385.

Lai, E. C. 2005. miRNAs: whys and wherefores of miRNA-mediated regulation. *Curr. Biol.* 15:R458–R460.

Lam, Y. W., et al. 2005. The nucleolus. *J. Cell Sci.* 118: 1335–1337.

Lynch, M. & Richardson, A. O. 2002. The evolution of spliceosomal introns. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 12:701–710.

Maquat, L. E. 2005. Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *J. Cell Sci.* 118:1773–1776.

Mattick, J. S. 2004. The hidden genetic program of complex organisms. *Sci. Amer.* pp. 61–67. October.

Mello, C. C., et al. 2004. Nature insight: RNA interference. *Nature* 431:337–378.

Mooney, R. A., et al. 2005. Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship. *Mol. Cell* 20:335–345.

Moore, P. B. & Steitz, T. A. 2002. The involvement of RNA in ribosome function. *Nature* 418:229–235.

Nirenberg, M. 2004. Historical review: deciphering the genetic code—a personal account. *Trends Biochem. Sci.* 29:46–54.

Noller, H. F., et al. 2005. Reviews and papers on RNA. *Science* 309:1508–1531.

Pearson, H. 2006. What is a gene? *Nature* 441:399–401.

Plasterk, R. H. A. 2006. Micro RNAs in animal development. *Cell* 124:877–881.

Raska, I., et al. 2006. Structure and function of nucleolus in the spotlight. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:325–334.

Roy, S. W. & Gilbert, W. 2006. The evolution of spliceosomal introns: patterns, puzzles and progress. *Nature Revs. Gen.* 7:211–221.

Scherrer, K. 2003. Historical review: The discovery of “giant” RNA and RNA processing: 40 years of enigma. *Trends Biochem. Sci.* 28:566–571.

Shilatifard, A., et al. 2003. The RNA polymerase II elongation complex. *Annu. Rev. Biochem.* 72:693–715.

Sims, R. J., III., et al. 2004. Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev.* 18:2437–2468.

Smale, S. T. & Kadonaga, J. T. 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* 72:449–479.

Sontheimer, E. J. 2005. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 6:127–138.

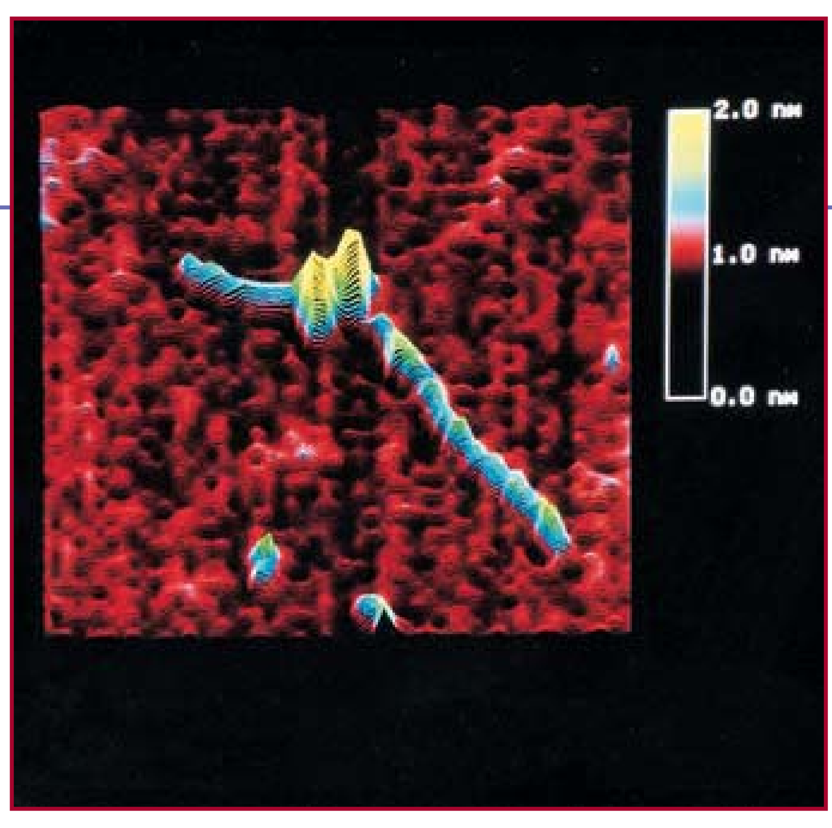
Tang, G. 2005. siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem. Sci.* 30:106–114.

Tomari, Y. & Zamore, P. D. 2005. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* 19:517–529.

Vogel, G. 1998. Tracking the history of the genetic code. *Science* 281:329–331.

Willingham, A. T. & Gingeras, T. R. 2006. TUF love for “junk” DNA. *Cell* 125:1215–1220. [RNA no codificadores.]

CAPÍTULO 12



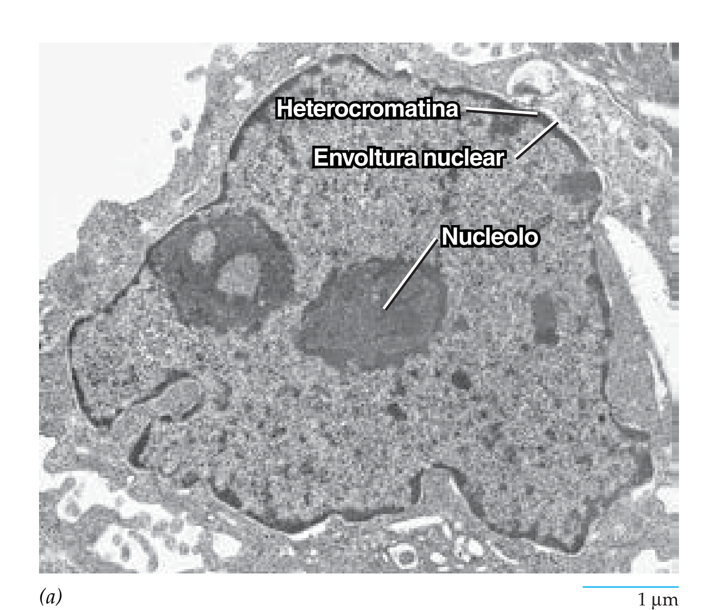
El núcleo celular y el control de la expresión génica

No obstante las obvias diferencias en forma y función, las células que forman parte de un organismo multicelular contienen un equipo completo de genes. La información genética presente en las células eucariotas especializadas puede compararse a un libro con el anteproyecto para construir un edificio gigante de propósitos múltiples. Durante la construcción del mismo, el anteproyecto completo será requerido con toda probabilidad, pero sólo pequeñas partes de la información que encierra servirán para la consulta durante el trabajo de construcción de un cuarto o un piso en particular. Lo mismo vale en el caso de un huevo fertilizado, el cual contiene instrucciones genéticas completas que se copian con la mayor fidelidad y se distribuyen en cada célula de un organismo en desarrollo. El resultado consiste en que las células diferenciadas portan mucha más información genética de la que alguna vez pueden llegar a necesitar. En consecuencia, las células disponen de mecanismos que les permiten expresar la información genética que contienen de manera selectiva, a lo que siguen las instrucciones necesarias para cada célula en determinado momento. En el presente capítulo se exploran algunas de las vías por medio de las cuales las células controlan la expresión genética, y por lo tanto se aseguran que ciertas proteínas se sinteticen mientras que otras no. Sin embargo, la explicación comenzará por la descripción de la estructura y propiedades del núcleo de la célula eucariota, sitio donde se localiza gran parte de la maquinaria reguladora.

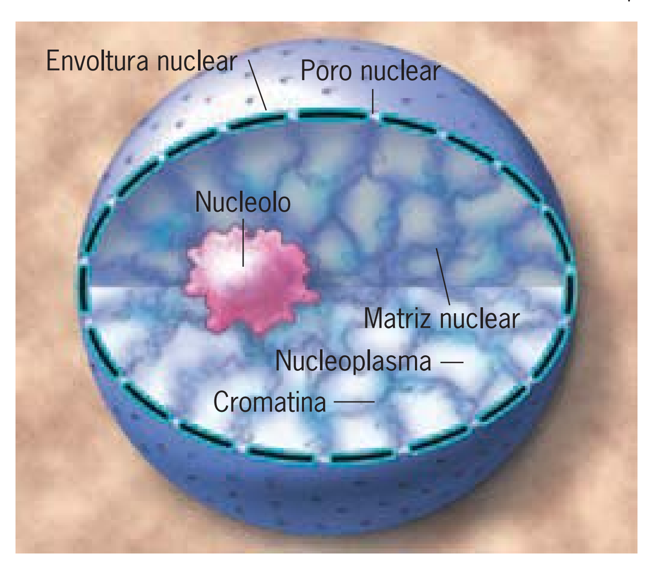
Micrografía electrónica de barrido de una molécula de DNA bacteriano (en azul) con una proteína reguladora (que se llama NtrC y que se observa en tonos amarillentos) unida en un sitio ubicado justo arriba de un gen que codifica para la sintetasa de glutamina. La fosforilación de la proteína NtrC permite activar la transcripción del gen regulado. Un microscopio electrónico de barrido mide la altura del espécimen en varias partes a nivel atómico, que se convierte en colores como los que se muestran en la figura del recuadro superior derecho. (Tomada de I. Rombel et al., por cortesía de S. Kustu, University of California, Berkeley, Cold Springs Harbor Symp. Quant. Biol. 63:160, 1998.)

12.1 EL NÚCLEO DE UNA CÉLULA EUCARIOTA

Si se considera su importancia en el almacenamiento y la utilización de la información genética, el núcleo de una célula eucariota tiene una morfología más bien común (fig. 12-1). El contenido del núcleo se presenta como una masa amorfa y viscosa de material encerrada por una *envoltura nuclear* compleja, que forma una transición entre el núcleo y el citoplasma. Dentro del núcleo de una interfase típica (es decir, no mitótica) la célula tiene: 1) los cromosomas, que se observan como fibras de nucleoproteína muy extendidas, denominadas *cromatina*; 2) uno o más *nucleolos*, estructuras electrodensas de forma irregular que funcionan en la síntesis del RNA ribosómico (ácido ribonucleico) y el ensamble de ribosomas (se explica en la pág. 440); 3) el *nucleoplasma*, una sustancia líquida en la que los solutos del núcleo se disuelven, y 4) la *matriz nuclear*, una red fibrilar que contiene proteínas.



(a) 1 μm

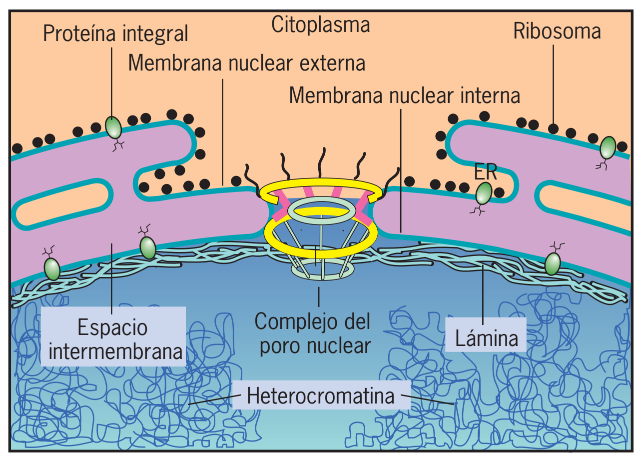


(b)

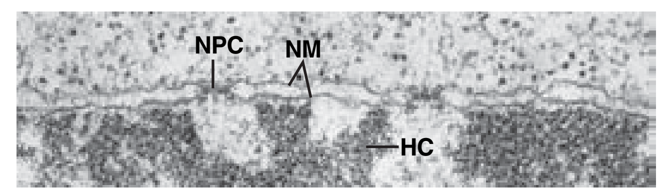
FIGURA 12-1 El núcleo celular. *a*) Micrografía electrónica de un núcleo de célula HeLa en interfase. La heterocromatina (pág. 496) es evidente alrededor de la superficie interna de la envoltura nuclear. Pueden verse dos nucleolos prominentes y algunos grumos de cromatina diseminados en el nucleoplasma. *b*) Esquema que muestra algunos de los principales componentes del núcleo. (*A*, TOMADA DE WERNER W. FRANKE, INT REV CYTOL 4(SUPL):130, 1974.)

La envoltura nuclear

La separación del material genético de una célula y el citoplasma circundante puede ser la distinción más importante entre eucariotas y procariotas, lo que confiere el carácter de punto de referencia de la evolución biológica a la aparición de la **envoltura nuclear**. La envoltura nuclear consta de dos membranas celulares organizadas en paralelo una con la otra y separadas por un espacio de 10 a 50 nm (fig. 12-2*a*). Las membranas de la envoltura nuclear sirven como una barrera que protege los iones, los solutos y las macromoléculas que pasan entre el núcleo y el citoplasma. Las dos membranas se fusionan en sitios que forman poros circulares que contienen proteínas organizadas en complejos. Una célula de mamífero promedio contiene varios



(a)



(b) 0.2 μm

FIGURA 12-2 La envoltura nuclear. *a*) Esquema que muestra la membrana doble, el complejo del poro nuclear, la lámina nuclear y la continuidad de la membrana externa con el retículo endoplásmico rugoso. *b*) Micrografía electrónica de un corte a través de una porción de la envoltura nuclear de una célula de raíz de cebolla. Nótense la doble membrana (NM) con un espacio interpuesto, el complejo del poro nuclear (NPC) y la heterocromatina relacionada (HC) que no se extiende en la región de los poros nucleares. (*B*, TOMADA DE WERNER W. FRANKE ET AL., J. CELL BIOL, 91:47s, 1981; MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

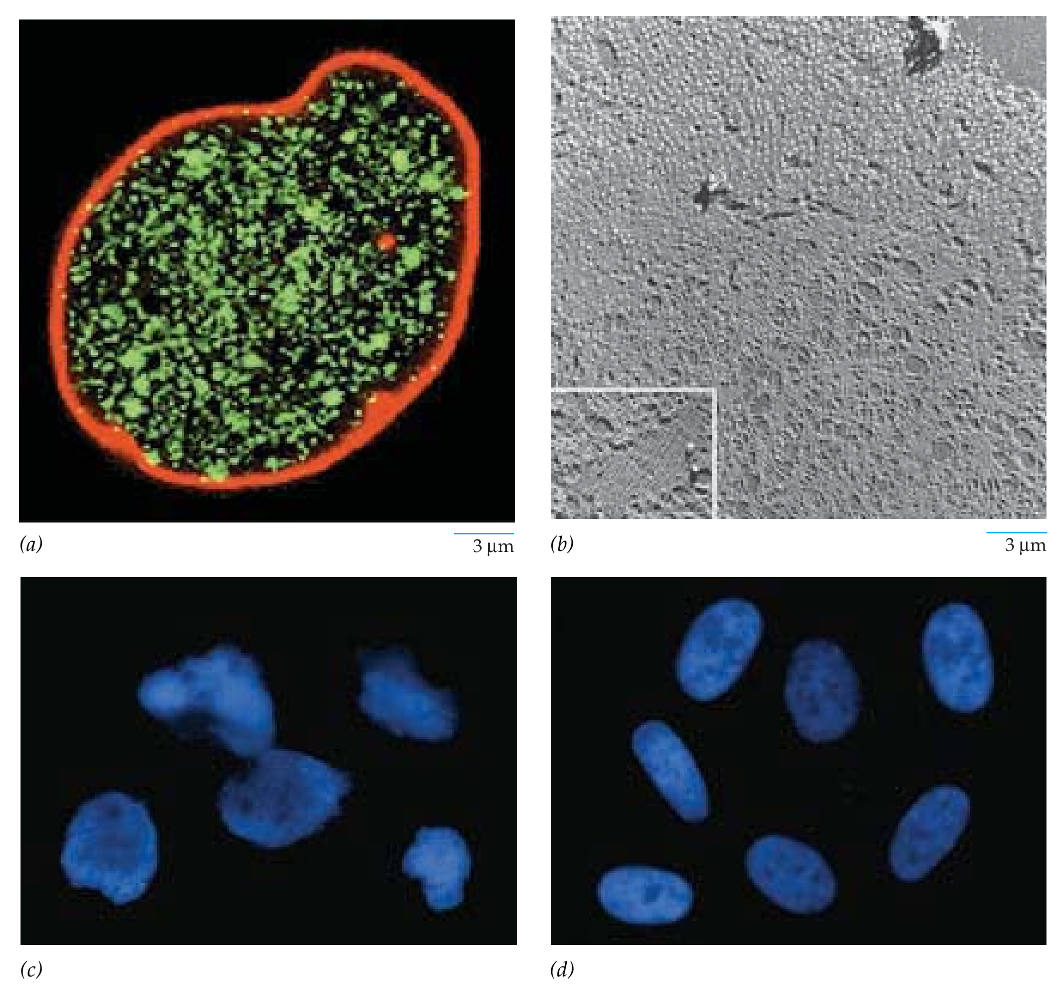


FIGURA 12-3 La lámina nuclear. *a*) Núcleo de una célula humana cultivada que se tiñó con anticuerpos marcados con fluorescencia para revelar la lámina nuclear (rojo), que se encuentra en la superficie interna de la envoltura nuclear. La matriz nuclear (pág. 508) se tiñó en verde. *b*) Micrografía electrónica de una envoltura nuclear seca y congelada, sombreada con polvo metálico, que proviene del oocito de *Xenopus* que se extrajo con el detergente no iónico Triton X-100. La lámina aparece como una malla continua que comprende filamentos orientados de manera perpendicular el uno con el otro. El recuadro muestra un área bien preservada en la que los poros nucleares se eliminaron por medios mecánicos. *c* y *d*, Núcleos de fibroblasto de un paciente con HGPS (*c*) y núcleos testigos (*d*). Los núcleos deformes en (*c*) contienen una lámina nuclear con una proteína lámina A truncada. (*A*, TOMADA DE H. MA, A. J. SIEGEL Y R. BEREZNEY, J CELL BIOL, 146:535, 1999. MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS; *B*, REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE U. AEBI, J. COHN, L. BUHLE Y L. GERACE, NATURE 323:561, 1986; © DERECHOS RESERVADOS 1986, MACMILLAN MAGAZINES LIMITED. *C-D*, DE G. NOVELLI AND M. R. D'APICE, TRENDS MOL. MED. 9:371, 2003; COPYRIGHT 2003, CON AUTORIZACIÓN DE ELSEVIER SCIENCE.)

miles de proteínas nucleares. Por lo general la membrana externa está tapizada con ribosomas y se continúa con la membrana del retículo endoplásmico rugoso (ER). El espacio entre las membranas se continúa con la luz del ER (fig. 12-2*a*).

La superficie interna de la envoltura nuclear de las células animales se une mediante proteínas del tipo integral de membrana a una delgada red de filamentos que se conoce como **lámina nuclear** (fig. 12-3). La lámina nuclear brinda el apoyo mecánico a la envoltura nuclear y sirve como sitio de unión para las fibras de cromatina de la periferia nuclear (fig. 12-2*b*); asimismo, participa (de una manera que aún no se comprende bien) en la duplicación y transcripción del DNA (ácido desoxirribonucleico). Los filamentos de la lámina nuclear miden alrededor de 10 nm de diámetro y se componen de polipéptidos, denominados *láminas*. Las láminas son miembros de la misma superfamilia de polipéptidos que se ensamblan en filamentos intermedios de 10 nm del citoplasma (pág. 357). Como en el citoplasma, la integridad de los filamentos intermedios que forman la lámina nuclear se regula por fosforilación y desfosforilación. Se piensa que el desensamble de la lámina nuclear previo a la mitosis se induce por fosforilación de las láminas mediante una cinasa de la proteína específica.

Las mutaciones en uno de los genes de la lamina (*LMNA*) son la causa de diversas enfermedades del ser humano, incluida una forma rara de distrofia muscular (llamada EDMD2) en la cual las células musculares contienen núcleos excepcionalmente frágiles. Las mutaciones en la lamina A, también se han vinculado con una enfermedad llamada síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS, del inglés *Hutchinson-Gilford progeria syndrome*), que se caracteriza por envejecimiento prematuro y muerte durante la adolescencia a causa de ataque cardiaco o apoplejía. En la figura 12-3*c* se muestran los núcleos malformados de las células de un paciente con HGPS, lo cual demuestra la importancia de la lámina nuclear como una determinante de la estructura del núcleo. Resulta interesante notar que el fenotipo ilustrado en la figura 12-3*c* se ha rastreado hasta una mutación sinónima, esto es, una que generó un codón diferente a partir del mismo aminoácido. En este caso, el cambio en la secuencia de DNA alteró el modo en que se empalmó la transcripción génica, lo cual condujo a la producción de una proteína más corta, con la consecuencia del genotipo alterado. Este ejemplo ilustra el modo en que la secuencia de un gen sirve como "código doble", uno que dirige la maquinaria de traducción y otro que dirige la maquinaria de empalme.

La estructura del complejo del poro nuclear y su función en el intercambio nucleocitoplásmico La envoltura nuclear es la barrera entre el núcleo y el citoplasma, y los poros nucleares son las compuertas para cruzar esta barrera. A diferencia de la membrana citoplásmica, que previene el paso de macromoléculas entre el citoplasma y el espacio extracelular, la envoltura nuclear es un punto de actividad para el movimiento del RNA y proteínas en ambas direcciones entre el núcleo y el citoplasma. La replicación y la transcripción del material genético al interior del núcleo requieren la participación de gran número de proteínas que se sintetizan en el citoplasma y se transportan a través de la envoltura nuclear. En cambio, los mRNA, los tRNA y las subunidades ribosómicas que se manufacturan en el núcleo deben transportarse por la envoltura nuclear en dirección opuesta. Algunos componentes, como los snRNA del espliceosoma (pág. 454), se mueven en ambas direcciones; éstos se sintetizan en el núcleo, se ensamblan en las partículas de RNP (ribonucleoproteína) en el citoplasma y luego regresan al núcleo, donde participan en el procesamiento de mRNA. Para apreciar la magnitud del tráfico entre los dos componentes celulares principales, considérese una célula HeLa, que se estima contiene alrededor de 10 000 000 de ribosomas. A fin de ensamblar este gran número de ribosomas, un solo núcleo de HeLa debe importar cerca de 560 000 proteínas ribosómicas y exportar aproximadamente 14 000 subunidades ribosómicas cada minuto.

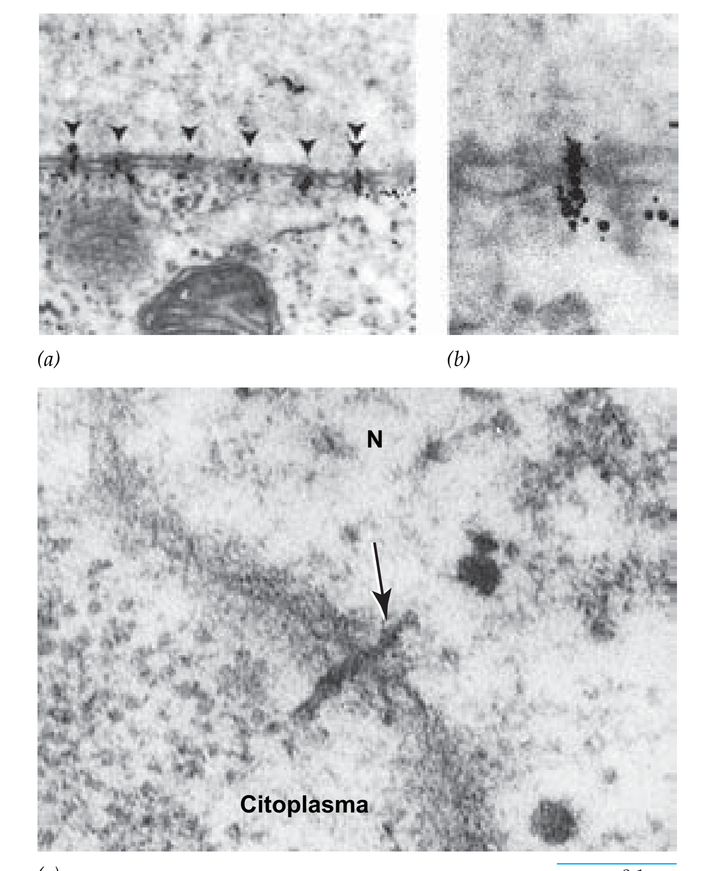


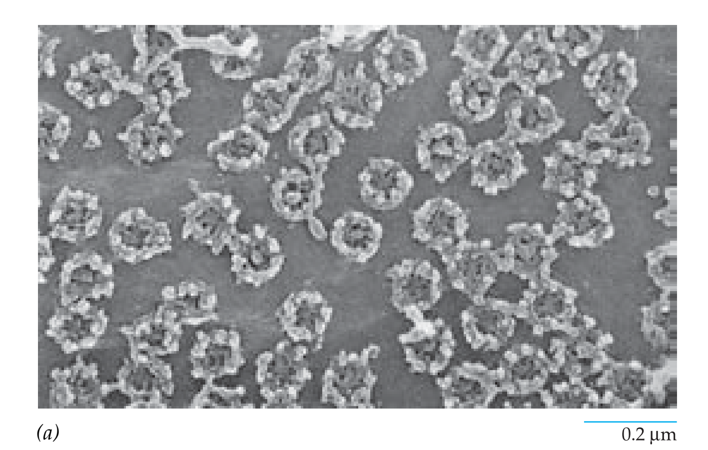
FIGURA 12-4 Movimiento de materiales a través del poro nuclear. *a*) Micrografía electrónica de un extremo del citoplasma nuclear de un oocito de rana tomado minutos después de la inyección con partículas de oro cubiertas con una proteína que en condiciones normales se encuentra en el núcleo. Se observa que estas partículas pasan a través del centro del poro nuclear (flechas) en su ruta desde el citoplasma hacia el núcleo. *b*) En una magnificación mucho más definida puede verse que las partículas de oro se organizan en un arreglo lineal dentro de cada poro. *c*) Micrografía electrónica de un corte a través de la envoltura nuclear de una célula de insecto que muestra el movimiento del material granular (al parecer se trata de una subunidad ribosómica) a través del poro nuclear. (*A-B*, CORTESÍA DE C. M. FELDHERR; *C*, TOMADA DE BARBARA J. STEVENS Y HEWSON SWIFT, J CELL BIOL, 31:72, 1966; MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

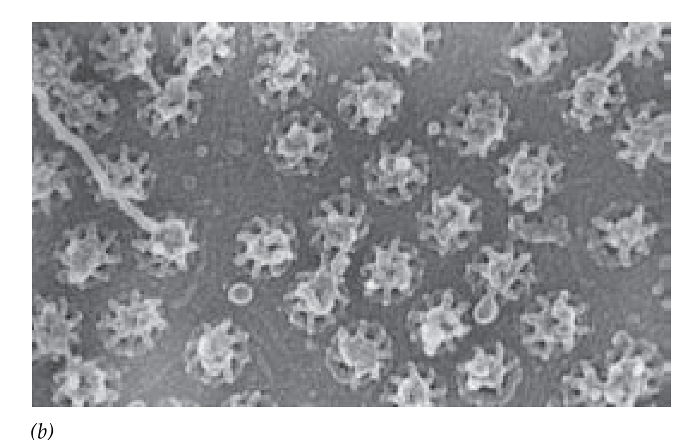
¿Cómo pasan todos estos materiales a través de la envoltura nuclear? En una aproximación inicial, una suspensión de diminutas partículas de oro se inyectó en células y su paso a través de la envoltura nuclear se observó al microscopio electrónico. Como se ilustra en la figura 12-4*a, b*, estas partículas se mueven del citoplasma al núcleo mediante el paso de una sola fila por el centro de los poros nucleares. Las micrografías electrónicas de células fijadas en el curso normal de sus actividades también muestran que el material particulado puede pasar a través de un poro nuclear. La figura 12-4*c* presenta un ejemplo en el que se presume que el material granular consiste en una subunidad ribosómica que pasa por uno de los poros.

Con base en el hecho de que materiales tan grandes como las partículas de oro y las subunidades ribosómicas penetran por los poros nucleares, podría asumirse que estos poros son canales de abertura, pero es todo lo contrario. Los poros nucleares contienen un aparato complejo en forma de canastilla denominado **complejo de poro nuclear** (**NPC**) que al parecer sella el poro de manera similar a un tapón, que se proyecta tanto al citoplasma como al nucleoplasma. La estructura del complejo de poro nuclear puede verse en las micrografías electrónicas de la figura 12-5 y el modelo de la figura 12-6. El complejo de poro nuclear es un complejo supramolecular característico (de 15 a 30 veces la masa del ribosoma) que presenta simetría octagonal a causa de la repetición óctuple de varias estructuras (fig. 12-6). A pesar de su tamaño y complejidad considerables, los NPC contienen sólo alrededor de 30 proteínas diferentes, denominadas *nucleoporinas*, que están muy conservadas entre las levaduras y los vertebrados. Cada nucleoporina está presente en por lo menos ocho copias, en relación con la simetría octagonal de la estructura.

Cuando solutos de bajo peso molecular se inyectan en el citoplasma de una célula, penetran con rapidez los poros nucleares por difusión simple. Tales solutos pueden difundirse a través de las ranuras entre las columnas que conectan los anillos citoplásmicos y nucleares del complejo de poro nuclear (fig. 12-6). Por otro lado, se cree que las proteínas y los RNA pasan a través del canal central del complejo de poro nuclear, como se describe más adelante. El paso de las macromoléculas hacia adentro y hacia afuera del núcleo requiere la ayuda de sistemas de transporte especial.

En 1982, Robert Laskey y sus colaboradores del *Medical Research Council* de Inglaterra encontraron que la nucleoplasmina, una de las proteínas que más abundan en el núcleo de los oocitos de anfibio, contiene un grupo de aminoácidos cercanos a su grupo carboxilo terminal (C-terminal) que funcionan como una **señal de localización nuclear** (**NLS**). Esta secuencia capacita a una proteína para que pase por los poros nucleares y penetre en el núcleo. La mejor estudiada, o NLS "clásica", consiste en una o dos secuencias cortas de aminoácidos con carga positiva. El





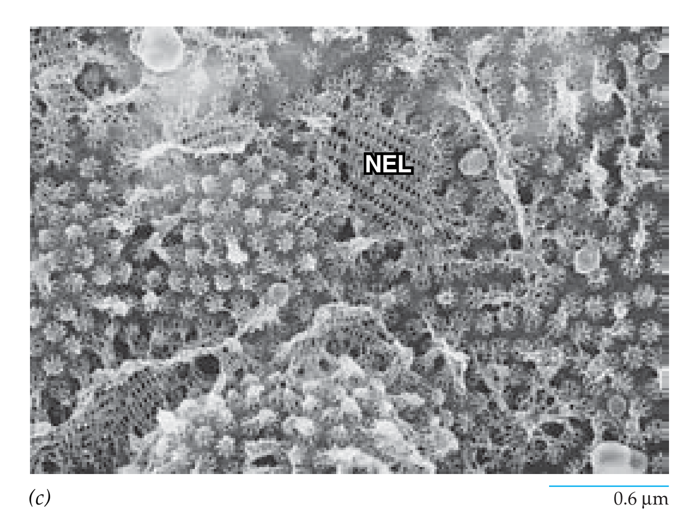


FIGURA 12-5 Micrografía electrónica de barrido de un complejo de poro nuclear de envolturas nucleares aisladas de un oocito de anfibio. *a*) Cara citoplásmica de la envoltura nuclear que muestra los gránulos citoplásmicos periféricos de un complejo de poro nuclear. *b*) Cara nuclear de la envoltura nuclear que muestra una apariencia semejante a una canasta en la parte interna de la porción del complejo. *c*) Cara nuclear de la envoltura que muestra la distribución de los NPC y los sitios donde las porciones intactas de la lámina nuclear (NEL) se conservan. En todas estas micrografías las envolturas nucleares aisladas se fijaron, deshidrataron y cubrieron con metal. (TOMADA DE M. W. GOLDBERG Y T. D. ALLEN, J CELL BIOL., 119:1431, 1992; MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

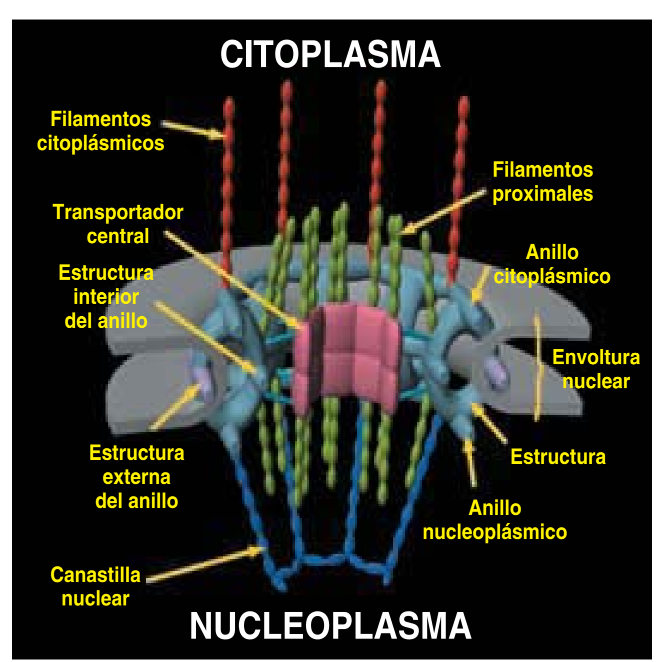
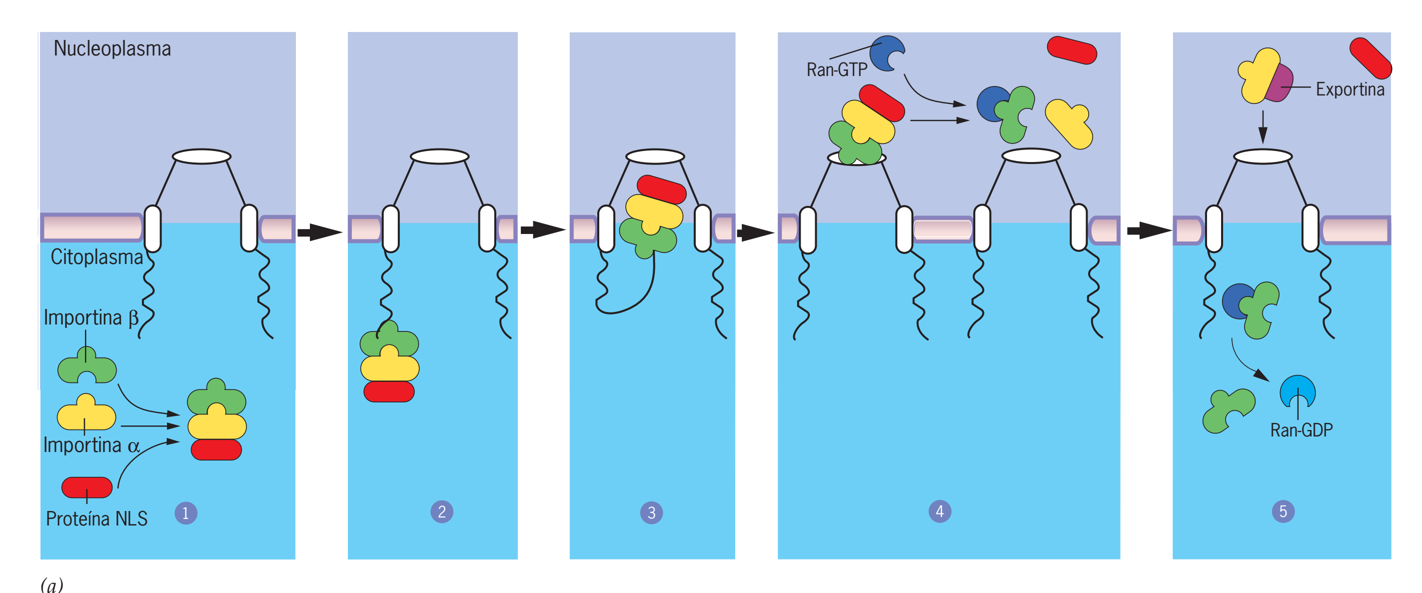


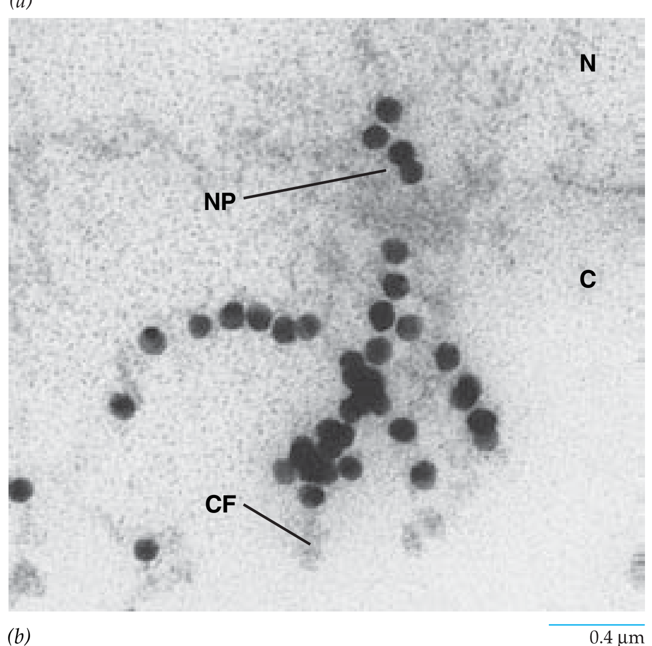
FIGURA 12-6 Un modelo de un complejo del poro nuclear (NPC) de vertebrado. Representación tridimensional de un NPC de vertebrado situado dentro de la envoltura nuclear. Esta estructura elaborada consta de diferentes partes, inclusive una especie de anillo ensamblado (que se muestra en azul y gris), una canastilla nuclear (en azul) que semeja una red de pesca y ocho filamentos citoplásmicos (en rojo). En este modelo las estructuras rodean un tubo central, llamado transportador (que se muestra en rosa). La naturaleza, y aun la existencia de un transportador central, es motivo de controversias recientes. (ADAPTADA DE M. P. ROUT Y J. D. AITCHISON, J BIOL CHEM, VOL. 276, NÚM. 20, 16593-16596, 2001.)

antígeno T codificado por el virus SV40, por ejemplo, contiene una señal de localización nuclear que se identifica como -Pro-Lis-Lis-Lis-Arg-Lis-Val-. Si un aminoácido apolar remplaza uno de los aminoácidos básicos en esta secuencia, la proteína no puede localizarse en el núcleo. Por el contrario, si esta señal de localización nuclear se fusiona con una proteína extranuclear, como la albúmina de suero, y se inyecta en el citoplasma, la proteína modificada se concentra en el núcleo. Por tanto el direccionamiento de proteínas hacia el núcleo es similar en principio al tráfico de otras proteínas que se destinan a la segregación dentro de un organelo, como una mitocondria o un peroxisoma (pág. 318). En todos estos casos las proteínas poseen una "dirección" específica que es reconocida por un receptor específico que media su transporte hacia el interior del organelo.

El estudio del transporte nuclear es un campo de investigación muy activo, impulsado por el desarrollo de sistemas in vitro capaces de importar de manera selectiva proteínas y RNP hacia el núcleo. Mediante estos sistemas los investigadores pueden identificar qué proteínas se requieren para la importación nuclear de una macromolécula particular. Estos esfuerzos identificaron una familia de proteínas que funcionan como *receptores de transporte*, que mueven macromoléculas a través de la envoltura nuclear. Dentro de esta familia, las *importinas* mueven macromoléculas del citoplasma hacia el núcleo y las *exportinas* lo hacen en la dirección opuesta.



(a)



(b) 0.4 µm

FIGURA 12-7 Importación de proteínas del citoplasma al núcleo. *a*) Pasos propuestos de la importación de proteínas al núcleo según se describen en el texto. Las proteínas que portan una señal de localización nuclear (NLS) se unen a un receptor heterodimérico (importina alfa/beta) (paso 1) para formar un complejo que se relaciona con los filamentos citoplásmicos (paso 2). El receptor del complejo de carga se mueve a través del poro nuclear (paso 3) y al interior del nucleoplasma donde interactúa con la Ran-GTP y se disocia (paso 4). La subunidad de importina beta, en relación con Ran-GTP, se transporta de nuevo al citoplasma, donde Ran-GTP se hidroliza (paso 5). Después Ran-GDP se transporta de nuevo al núcleo, donde se convierte en Ran-GTP. En cambio, la importina alfa se transporta de regreso al citoplasma. *b*) La nucleoplasmina es una proteína presente en grandes concentraciones en el nucleoplasma de los oocitos de *Xenopus*. Cuando las partículas de oro se cubren con proteína nucleoplasmina y se inyectan dentro del citoplasma de los oocitos de *Xenopus*, puede verse que se unen a los filamentos citoplásmicos (CF) que se proyectan desde el anillo externo del complejo del poro nuclear. También se observa que varias partículas transitan a través del poro nuclear (NP) hacia el núcleo. (*A*, CON BASE EN UN MODELO DE M. OHNO ET AL., CELL 92:327, 1998; *B*, TOMADA DE W. D. RICHARDSON ET AL., CELL 52:662, 1988; CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS, CORTESÍA DE A. D. MILLS.)

La figura 12-7*a* describe algunos de los pasos principales que ocurren durante la importación nuclear de una proteína, como una nucleoplasmina, que contiene una señal de localización nuclear clásica. La importación inicia como una proteína que contiene la NLS unida a un receptor soluble de NLS heterodimérico, conocido como *importina alfa/beta*, que reside en el citoplasma (paso 1, fig. 12-7*a*). Al parecer el receptor de transporte escolta la proteína "de carga" a la superficie externa del núcleo donde ésta se ancla a los filamentos citoplásmicos que se extienden desde el anillo externo del complejo de poro nuclear (paso 2). La figura 12-7*b* muestra un número de partículas de oro unidas a estos filamentos; estas partículas se cubrieron con una proteína nuclear que contiene la señal de localización nuclear que se transporta a través del complejo del poro nuclear. El complejo receptor-carga se mueve luego a través del poro nuclear (paso 3, fig. 12-7*a*), al parecer mediante "brincos" de un sitio de unión en el complejo de poro nuclear al siguiente. La translocación a través del NPC puede acompañarse de cambios en la conformación de ciertos componentes del complejo de poro nuclear que permiten que la proteína "de carga" entre al nucleoplasma.

Una vez que la proteína cargada pasó a través del complejo de poro nuclear y llegó al compartimiento nuclear es necesario introducir otra molécula clave, una proteína que une GTP (trifosfato de guanosina) y se conoce como **Ran**. Del mismo modo que otras proteínas que unen GTP, como Sarl (pág. 300) y EF-Tu (pág. 473) descritas en capítulos anteriores, Ran puede presentarse en forma activa unida a GTP o inactiva unida a GDP (difosfato de guanosina). La función de Ran en la regulación del transporte nucleocitoplásmico se basa en mecanismos en los que la célula mantiene una alta concentración de proteína Ran-GTP en el núcleo y una concentración muy baja de proteína Ran-GTP en el citoplasma. El gradiente tan alto de Ran-GTP a través de la envoltura nuclear depende de la compartimentalización de ciertas proteínas accesorias (véase la figura 15-19*b* para encontrar una mayor explicación). Una de estas proteínas

accesorias (*RCC1*) se secuestra en el núcleo, donde promueve la conversión de Ran-GDP en Ran-GTP y de esta forma mantiene el alto nivel nuclear de Ran-GTP. Otra proteína accesoria (*RanGAP1*) reside en el citoplasma, donde facilita la hidrólisis de Ran-GTP en Ran-GDP y mantiene el bajo nivel citoplásmico de Ran-GTP. Por tanto, la energía liberada por la hidrólisis de GTP se emplea en la conservación del gradiente de Ran-GTP a través de la envoltura nuclear. Como se discute más adelante, el gradiente Ran-GTP impulsa el transporte nuclear por un proceso que depende sólo de la difusión mediada por receptor; en este proceso no participan proteínas motoras o ATP-asas.

Ahora puede regresarse a la descripción de la vía clásica de la importación de NLS. Cuando el complejo importina-carga llega al núcleo, lo recibe una molécula de Ran-GTP, que se une al complejo y causa su desensamblaje como se indica en el paso 4 de la figura 12-7*a*. Ésta es la función aparente del alto nivel de Ran-GTP en el núcleo: la promoción del desensamblaje de los complejos importados del citoplasma. La carga importada se libera en el nucleoplasma y una porción de receptor de NLS (la subunidad importina beta) se lanza de regreso al citoplasma junto con la proteína Ran-GTP (paso 5). Una vez en el citoplasma, la molécula de GTP unida a Ran se hidroliza y libera Ran-GDP de la subunidad beta de la importina. Ran-GDP regresa al núcleo, donde se convierte de nuevo en la molécula de unión de estado GTP para efectuar ciclos adicionales de actividad. La importina alfa se transporta nuevamente hacia el núcleo mediante una de las exportinas.

Ran-GTP desempeña una función importante en la escolta de macromoléculas desde el núcleo, del mismo modo que lo hace en su importación desde el citoplasma. Recuérdese que, en esencia, Ran-GTP se confina al núcleo. Mientras que Ran-GTP induce el desensamble de complejos importados, como se muestra en el paso 4 de la figura 12-7*a*, Ran-GTP promueve el *ensamble* de complejos de exportación. Las proteínas exportadas del núcleo contienen secuencias aminoacídicas denominadas *señales de exportación nuclear*, o *NES*, que son reconocidas por receptores de transporte que las acarrean a través de la envoltura nuclear hacia el citoplasma. La mayor parte del movimiento de tránsito en esta dirección consiste en varios tipos de moléculas de RNA —mRNA, rRNA y tRNA— que se sintetizan en el núcleo y funcionan en el citoplasma. En la mayoría de los casos estos RNA se mueven a través del NPC como ribonucleoproteínas (RNP).

Como se señaló en la página 476, cuando un pre-mRNA se somete a *splicing*, un complejo de proteínas (el EJC) se deposita cerca del sitio de cada unión exón-exón (fig. 12-8). Una de estas proteínas (llamada Aly) tiene una función importante en la exportación de mRNA mediante la unión con un receptor de transporte especializado (que se conoce como TAP) para formar un complejo que puede moverse por el NPC hacia el citoplasma (fig. 12-8). Numerosos estudios demuestran un vínculo funcional entre el *splicing* de pre-mRNA y la exportación de mRNA; sólo los mRNA maduros (procesados por completo) pueden transportarse fuera del núcleo. Si un mRNA aún contiene un intrón no sometido a *splicing*, el RNA se retiene en el núcleo.

Cromosomas y cromatina

Al parecer los cromosomas aparecen al principio de la mitosis y desaparecen una vez que la división celular concluye. La aparición y desaparición de los cromosomas hizo surgir en los citólogos una pregunta que los desafiaba: ¿cuál es la naturaleza de los cromosomas en una célula no mitótica? En la actualidad se cuenta con la capacidad para generar una respuesta razonable a esta pregunta.

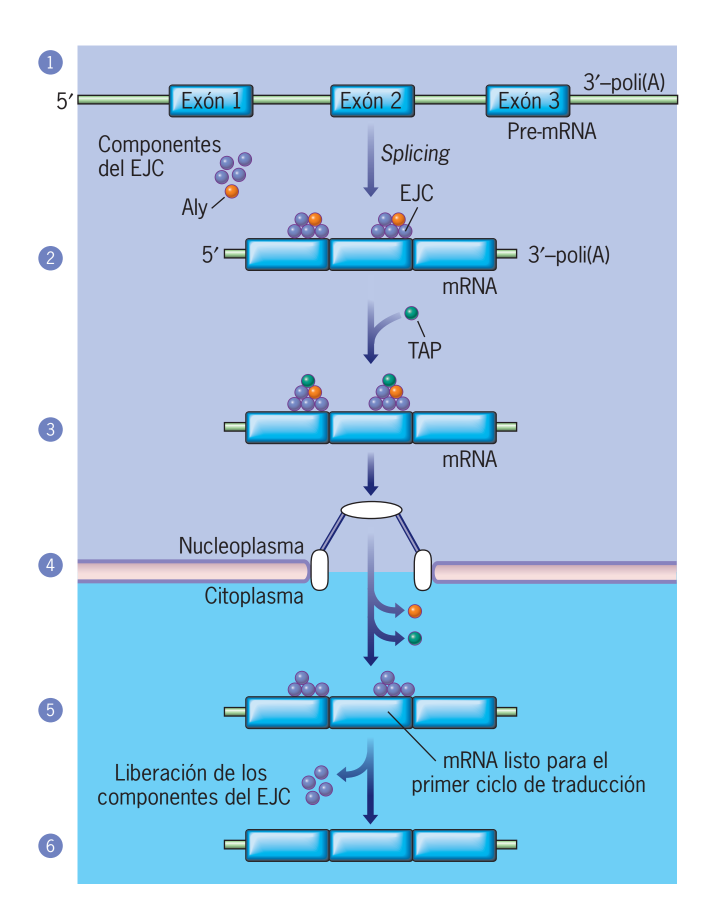


FIGURA 12-8 Exportación de mRNP desde el núcleo. El paso 1 muestra un pre-mRNA (transcripción primaria) que contiene tres exones y dos intrones. El pre-mRNA se somete a *splicing* para formar un mRNA maduro (paso 2) que contiene un complejo proteico (el EJC) que se deposita en el mRNA 20 a 24 nucleótidos corriente arriba de cada unión exón-exón. Una de las subunidades del EJC es la proteína Aly. En el paso 3 otra proteína llamada TAP se agrega a la molécula de mRNP, lo que la capacita para transportarse a través del NPC (paso 4). Después de pasar por el NPC, Aly y TAP se despegan del mRNP (paso 5) y el mRNA se traduce. Los EJC se desplazan desde el mRNA durante el primer ciclo de traducción (paso 6). Como se discute en la página 476, este proceso genera un mecanismo celular para identificar los mRNA que contienen un codón de terminación prematuro.

Empaquetamiento del genoma Una célula humana promedio contiene cerca de 6.4 mil millones de pares de bases de DNA divididos entre 46 cromosomas (el valor para el número de cromosomas diploides no replicados). Cada cromosoma no replicado contiene una molécula continua y única de DNA; entre más largo es el cromosoma, más largo es el DNA que contiene. Puesto que cada par de bases mide alrededor de 0.34 nm de longitud, la longitud de los 6 mil millones de pares de bases que constituyen una molécula de DNA completa se aproxima a 2 m. ¿Cómo pueden ajustarse 2 m de DNA en un núcleo de sólo 10 µm (1×10^{-5} m) de diámetro y al mismo tiempo mantener el DNA en un estado accesible para las enzimas y proteínas regu-

ladoras? De igual importancia, ¿cómo se organiza la única molécula de DNA de cada cromosoma de modo que no se enrede en forma irremediable con las moléculas de otros cromosomas? Las respuestas se encuentran en manera notable en que una molécula de DNA se empaqueta.

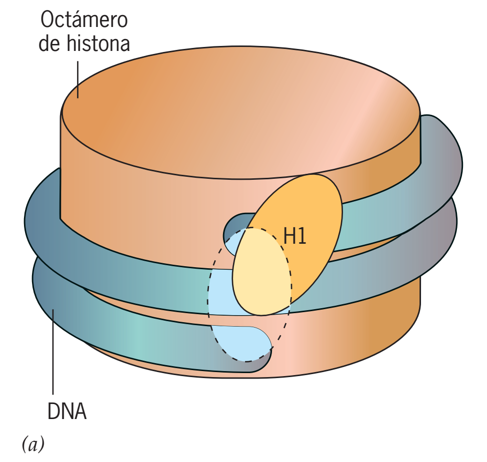
Nucleosomas: el nivel mínimo de organización cromosómica Los cromosomas se componen de DNA y proteínas relacionadas, que en conjunto se conocen como **cromatina**. El empaquetamiento ordenado del DNA eucariota depende de las **histonas**, un importante grupo de pequeñas proteínas que poseen un inusual contenido alto de los aminoácidos básicos arginina y lisina. Las histonas se dividen en cinco clases, que pueden distinguirse por su relación arginina/lisina (cuadro 12-1). Las secuencias aminoacídicas de las histonas, en particular H3 y H4, experimentaron pocos cambios durante largos periodos de la evolución. Por ejemplo, las histonas H4 tanto de guisantes como de vacas contienen 102 aminoácidos y sus secuencias difieren sólo en dos residuos de aminoácidos. ¿Por qué están tan conservadas las histonas? Una razón es que las histonas interactúan con el esqueleto de la molécula del DNA, que es idéntico en todos los organismos. Además casi todos los aminoácidos de una molécula de histona participan en una interacción con otra molécula, ya sea DNA u otra histona. Como resultado, muy pocos aminoácidos de una histona pueden remplazarse con otros aminoácidos sin afectar de manera significativa la función de la proteína.

A principio del decenio de 1970, se encontró que cuando la cromatina se trataba con nucleasas inespecíficas, la mayor parte de los DNA se convertían en fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases de longitud. En cambio, un tratamiento similar del DNA *desnudo* (es decir, DNA sin proteínas) producía al azar una población de fragmentos de DNA de diferentes tamaños. Este hallazgo sugirió que el DNA cromosómico estaba protegido del ataque enzimático, excepto en ciertos sitios repetidos a lo largo de su longitud. Se supuso que las proteínas relacionadas con DNA conferían la protección. En 1974, con los datos obtenidos de la digestión de nucleasa y otros tipos de información, entonces Roger Kornberg, en la *Harvard University*, propuso una estructura por completo nueva para la cromatina. Kornberg postuló que el DNA y las proteínas histónicas se organizan en subunidades repetidas, denominadas **nucleosomas**. Ahora se sabe que cada nucleosoma contiene una *partícula nuclear de nucleosoma* que consiste en 146 pares de bases de DNA superenrollado (pág. 400) envuelto por lo menos dos veces alrededor de un complejo en forma de disco de ocho moléculas de histona (fig. 12-9*a*). El núcleo de histona de cada nucleosoma consta de dos copias de cada histona H2A, H2B, H3 y H4, ensambladas en un octámero, como se discute más adelante. La histona restante (la del tipo H1) reside fuera de la partícula nuclear del nucleosoma. La histona H1 se refiere como *histona de unión* porque enlaza parte del DNA de unión que *conecta* una partícula del núcleo del nucleosoma con la siguiente. Los estudios con fluorescencia indican que las moléculas H1 se disocian y vuelven a unirse continuamente con cromatina. La proteína H1 y el octámero de histona interactúan juntos con alrededor de 168 pares de bases del DNA. Las moléculas de histona H1 pueden retirarse de manera selectiva de las fibras de cromatina mediante el tratamiento con soluciones de fuerza iónica baja. Cuando la cromatina libre de histona H1 se observa bajo el microscopio electrónico, las partículas nucleares del nucleosoma y el DNA desnudo que establece la unión entre histona e histona pueden

Cuadro 12-1 Histonas del timo de ganado bovino

Histona	Número de residuos	Masa (kDa)	%Arg	%Lis	UEP* ($\times 10^{-6}$ años)
H1	215	23.0	1	29	8
H2A	129	14.0	9	11	60
H2B	125	13.8	6	16	60
H3	135	15.3	13	10	330
H4	102	11.3	14	11	600

* Unidad de periodo evolutivo: el tiempo en que la secuencia de aminoácidos de una proteína cambia 1% después que dos especies divergieron.



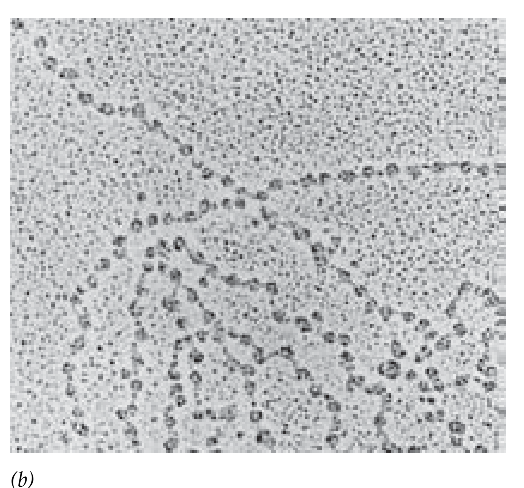
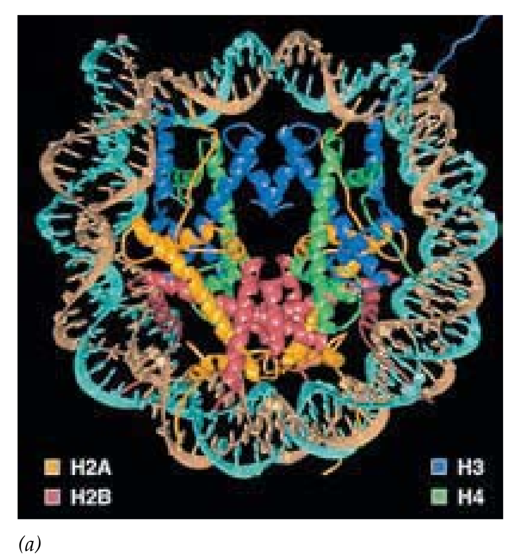
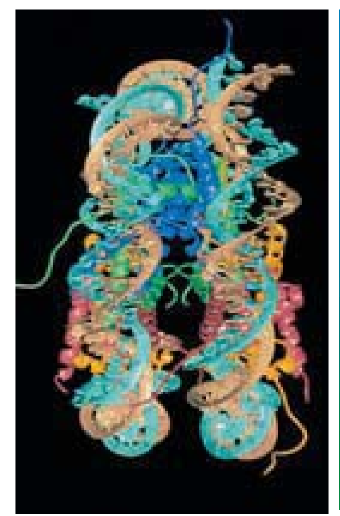


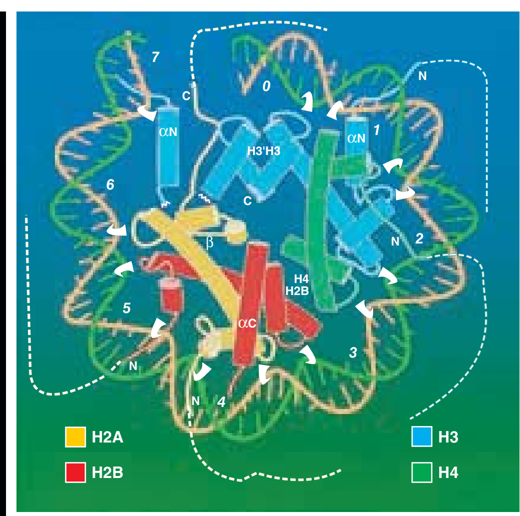
FIGURA 12-9 Organización de la cromatina en nucleosomas. *a*) Esquema que muestra la estructura de una partícula de nucleosoma nuclear y una molécula de histona H1 relacionada. La partícula nuclear por sí misma consiste en alrededor de 1.8 vueltas (146 pares de bases) de DNA superenrollado en forma negativa alrededor de las ocho moléculas de histona nuclear (dos de cada H2A, H2B, H3 y H4). La histona de unión H1 se une cerca de los sitios donde el DNA entra y sale del nucleosoma. Se muestran dos posiciones alternas de la molécula de H1. *b*) Micrografía electrónica de fibras de cromatina liberadas del núcleo de una célula de *Drosophila* en un amortiguador de muy baja fuerza iónica. Las partículas nucleares de nucleosoma miden cerca de 10 nm de diámetro y se conectan mediante cadenas cortas de DNA de unión, que miden alrededor de 2 nm de diámetro. (*B*, CORTESÍA DE OSCAR L. MILLER, JR.)



(a)



(b)



(c)

FIGURA 12-10 Estructura tridimensional de un nucleosoma como se revela mediante cristalografía de rayos X. *a*) Partícula nuclear de nucleosoma vista desde el eje central de la hélice de DNA, que muestra la posición de cada una de las ocho moléculas de histona en el núcleo octamérico. Se observa que las histonas se organizan dentro de cuatro complejos diméricos. Los dos dímeros H3 y H4 se vinculan entre sí en el centro de la partícula nuclear y forman un tetrámero, en tanto que los dos dímeros H2A-H2B se posicionan uno a cada lado del tetrámero $(H3\text{-}H4)_2$. Cada dímero de histona une 27 a 28 pares de bases de DNA, con contactos que ocurren donde el surco menor de DNA toca el núcleo de histona. *b*) Esta vista perpendicular al eje central evidencia la forma de disco de la partícula nuclear del nucleosoma. *c*) Modelo esquemático simplificado de la mitad de una partícula nuclear de nucleosoma que muestra una vuelta de la superhélice del DNA (73 pares de bases) y cuatro moléculas de histona nuclear. Las cuatro histonas se presentan en colores diferentes, como lo indica la clave de colores. Cada histona nuclear consta de: 1) una región globular, conocida como "histona plegada", que consiste en tres hélices alfa (representadas por los cilindros) y 2) una cola N-terminal extendida y flexible (indicada por la letra N) que se proyecta fuera del disco de histona más allá de la doble hélice de DNA. Los puntos intermitentes de interacción entre las moléculas de histona y el DNA se indican con ganchos de color blanco. Las líneas punteadas señalan la porción más externa de las colas de histona; estas colas flexibles carecen de una estructura terciaria definida y por tanto no aparecen en las estructuras obtenidas por rayos X que se muestran en *a* y *b*. (*A* Y *B*, REIMPRESAS CON AUTORIZACIÓN DE KAROLIN LUGER ET AL., NATURE 389:251, 1997; CORTESÍA DE TIMOTHY J. RICHMOND. *C*, REDIBUJADA DE D. RHODES; © DERECHOS RESERVADOS 1997, MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)

verse como elementos separados, lo que confiere la apariencia de "cuentas de un collar" (fig. 12-9*b*).

La comprensión del empaquetamiento del DNA avanzó de manera notable en años recientes gracias a los importantes datos de la partícula del núcleo de nucleosoma obtenidos por cristalografía de rayos X (fig. 12-10). Las ocho moléculas de histona que comprenden una proteína nuclear del nucleosoma se organizan en cuatro heterodímeros: dos dímeros H2A-H2B y dos dímeros H3-H4 (fig. 12-10*a*, *c*). La dimerización de las moléculas de histona es mediada por sus dominios C-terminal, que constan sobre todo de hélices alfa (representadas por cilindros en la figura 12-10*c*) plegadas en una masa compacta en el núcleo del nucleosoma. En cambio, el segmento amino terminal (N-terminal) de cada núcleo histónico (y también el segmento C-terminal de H2A) toma la forma de una cola flexible y larga (representada por las líneas punteadas en la figura 12-10*c*) que se extiende más allá de la hélice de DNA y hacia los alrededores. Estas colas son blanco de una variedad de modificaciones covalentes cuyas funciones clave se exploran más adelante en este capítulo.

Las modificaciones histónicas no son sólo un mecanismo para alterar las características de la histona de los nucleosomas. Además de las cuatro histonas "convencionales" que se discutieron antes, diferentes versiones alternativas de núcleo de histonas también se sintetizan en la mayor parte de las células. La importancia de estas variantes de histonas, como se denominan, aún no se determina, pero al parecer tienen funciones especializadas (cuadro 12-2). La localización y las presuntas funciones de una de estas variantes, CENP-A, se estudia en la página 506. Otra variante, la H2AX, se distribuye a través de la cromatina, donde remplaza a la histona convencional H2A en una fracción de los nucleosomas. H2AX se convierte en fosforilada en sitios de rotura de DNA y puede participar en el reclutamiento de las enzimas que reparan el DNA. Otras dos variantes de histonas centrales —H2AZ y H3.3— pueden incorporarse en nucleoso-

Cuadro 12-2 Variantes de histonas

Tipo	Variante	Localización	Función relacionada
H2A			
	H2AX	A lo largo de la cromatina	Reparación del DNA
	H2AZ	Eucromatina	Transcripción
	macroH2A	Inactivación del cromosoma X	Silenciamiento transcripcional
H3			
	CENP-A	Centrómero	Ensamble del cinetocoro
	H3.3	Transcripción de loci	Transcripción

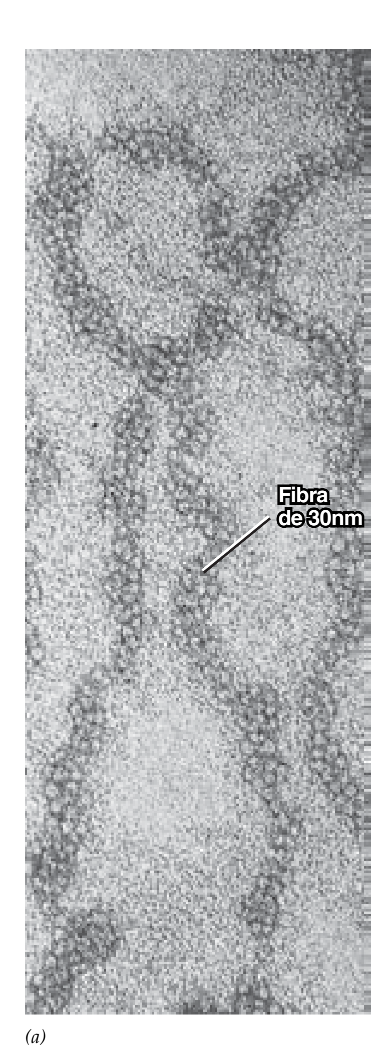
mas de genes cuando son activadas, y es posible que participen en promover la transcripción del locus genético.

El DNA y los núcleos de histonas se mantienen juntos mediante distintos tipos de enlaces no covalentes, inclusive los enlaces iónicos entre los fosfatos con carga negativa del esqueleto de DNA y los residuos con carga positiva de las histonas. Las dos moléculas hacen contacto en sitios donde el surco menor del DNA se relaciona con el núcleo de la histona, lo que ocurre a intervalos aproximados de 10 pares de bases (los ganchos blancos en la figura 12-10*c*). Entre estos puntos de contacto las dos moléculas están separadas por un espacio considerable, que debe brindar acceso a los factores de transcripción del DNA y otras proteínas que unen DNA. Aunque por muchos años se pensó que las histonas eran moléculas estructurales inertes, como se verá en las siguientes secciones, estas pequeñas proteínas tienen funciones de importancia crítica en la determinación de la actividad del DNA con el que se relacionan.

Esta sección inició resaltando cómo un núcleo de 10 μm de diámetro puede empaquetar 200 000 veces esta longitud de DNA dentro de sus límites. El ensamble de los nucleosomas es el primer paso importante en el proceso de compactación. Con un espaciamiento nucleótido-nucleótido de 0.34 nm, los 200 pares de bases de un solo nucleosoma de 10 nm deben alcanzar cerca de 70 nm de longitud si se extienden por completo. En consecuencia se dice que la relación de empaquetamiento del DNA de los nucleosomas se aproxima a 7:1.

Niveles elevados de la estructura de la cromatina Una molécula de DNA embobinada alrededor de las partículas nucleares del nucleosoma de 10 nm de diámetro es el nivel más bajo de organización de la cromatina. Sin embargo, la cromatina no existe dentro de la célula en su estado relativamente extendido, un estado que semeja las "cuentas de un collar". Las micrografías electrónicas de cortes a través del núcleo revelan gran número de pequeños puntos, de alrededor de 30 nm de diámetro, tres veces el tamaño de un nucleosoma. Estos puntos son fibras de cromatina que se seccionaron en un corte transversal. Cuando la cromatina se libera del núcleo y se prepara a fuerzas iónicas fisiológicas, se observa una fibra de grosor similar (30 nm) (fig. 12-11*a*). La estructura de la fibra de 30 nm permanece sujeta a debate a pesar de más de dos decenios de investigación. La figura 12-11*b*, *c* muestra dos modelos en los que el filamento nucleosómico se enrolla en un orden superior, una fibra más gruesa. Sin considerar la forma en que lo anterior se realiza, el ensamble de la fibra de 30 nm incrementa el índice de empaquetamiento unas seis veces más, o cerca de 40 veces en total.

El mantenimiento de las fibras de 30 nm depende de la interacción entre las moléculas de histona y los nucleosomas



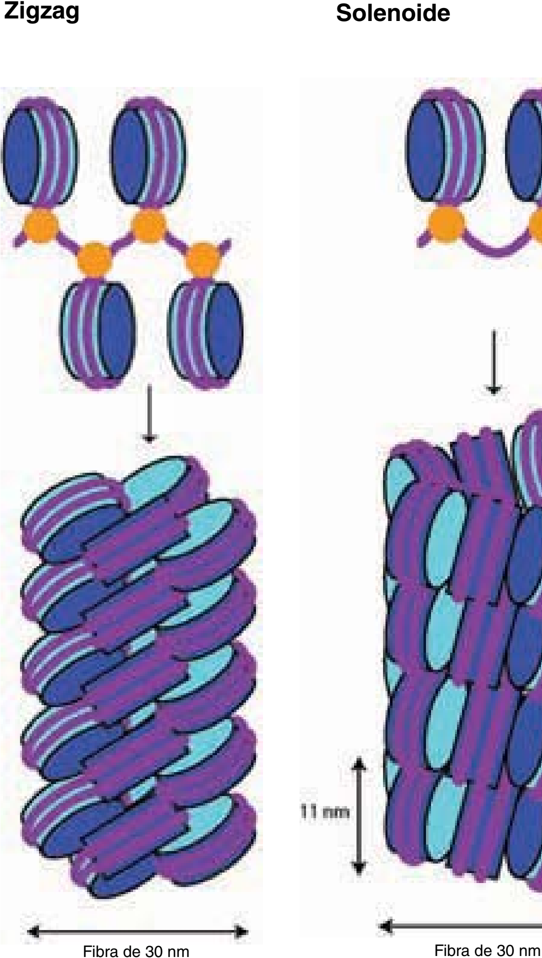


FIGURA 12-11 La fibra de 30 nm: un nivel superior de la estructura de la cromatina. *a*) Micrografía electrónica de una fibra de cromatina de 30 nm liberada del núcleo después de lisar una célula en una solución de sales hipotónicas. *b*) En el modelo de "zigzag", el DNA de unión se encuentra en un estado extendido recto que salta alternativamente entre partículas centrales consecutivas, que se organizan en pilas adyacentes de nucleosomas. *c*) En el modelo de "solenoide", el DNA de unión se curva suavemente al conectar partículas centrales consecutivas, que se organizan en una sola estructura helicoidal continua que contiene unos seis a ocho nucleosomas por vuelta. En estos modelos, el octámero de histona se muestra en azul, el DNA en magenta y la histona H1 de unión en amarillo. Varios experimentos recientes han aportado pruebas que apoyan el modelo en zigzag. (*A*, CORTESÍA DE BARBARA HAMKALO Y JEROME B. RATTNER; *B* Y *C*, TOMADAS DE SEPIDEH KHORASANIZADEH, CELL 116:262, 2004; CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS.)

vecinos. Las histonas de unión y las histonas nucleares participan en un empaquetamiento de orden superior de la cromatina. Si, por ejemplo, las histonas de unión H1 se extraen de manera selectiva de la cromatina compactada, las fibras de 30 nm no se enrollan para formar las cuentas de filamentos más delgados y extendidos que se muestran en la figura 12-9*b*. La nueva adición de histona H1 conduce a la restauración de la estructura de orden superior. Las histonas nucleares de los cromosomas adyacentes pueden interactuar una con otra por medio de sus colas flexibles y largas. Los estudios estructurales indican, por ejemplo, que la cola N-amino terminal de una histona H4 de una partícula nuclear de nucleosoma puede alcanzar el exterior y hacer contacto extensivo tanto con los enlaces (*linker*) de DNA entre las partículas de nucleosoma como con el dímero H2A/H2B de las partículas adyacentes. Se cree que estos tipos de interacción median el plegamiento de los filamentos nucleosómicos en fibras mucho más gruesas. De hecho las fibras de cromatina preparadas con histonas que pierden sus colas son incapaces de plegarse en fibras de un orden superior.

Se cree que la siguiente etapa en la jerarquía del empaquetamiento de DNA ocurre cuando los filamentos de cromatina de 30 nm se organizan en una serie de asas muy amplias superenrolladas, o dominios, que pueden compactarse en fibras aún más gruesas (de 80 a 100 nm). Al parecer las asas de DNA se unen en sus extremos con proteínas que forman parte de un andamiaje nuclear organizado o matriz (descrito en la pág. 508). Entre estas proteínas se encuentra una topoisomerasa tipo II que se presume regula el grado de superenrollamiento del DNA. Podría esperarse que la topoisomerasa también desenredara las moléculas de DNA de diferentes asas cuando están entrelazadas.

Por lo general las asas de las fibras de cromatina se diseminan dentro del núcleo y no es posible visualizarlas, pero su presencia puede revelarse en ciertas circunstancias. Por ejemplo, cuando cromosomas *mitóticos* aislados se tratan con reactivos que extraen las histonas, puede verse que el DNA libre de histona se extiende hacia afuera como asas de una proteína de andamiaje (fig. 12-12*a*). Tipos similares de asas pueden verse en los cromosomas en interfase politeno de células de insecto (véase fig. 10-8) y en la meiosis de los *cromosomas deshilachados* de oocitos de anfibio (fig. 12-12*b*).

Andamiaje

(*a*) 2 μm

(*b*) 30 μm

FIGURA 12-12 Asas de cromatina: un nivel superior de la estructura de la cromatina. *a*) Micrografía electrónica de un cromosoma mitótico que se trató con una solución de sulfato de dextrán para remover histonas. El cromosoma desprovisto de histonas muestra asas de DNA unidas por sus bases a una proteína residual de andamiaje. *b*) En esta micrografía de un cromosoma deshilachado aislado de un oocito de anfibio también se observan los dominios de cromatina que forman asas. (*A*, TOMADA DE JAMES R. PAULSON Y U. K. LAEMMLI, CELL 12:823, 1977; CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS; *B*, CORTESÍA DE JOSEPH G. GALL.)

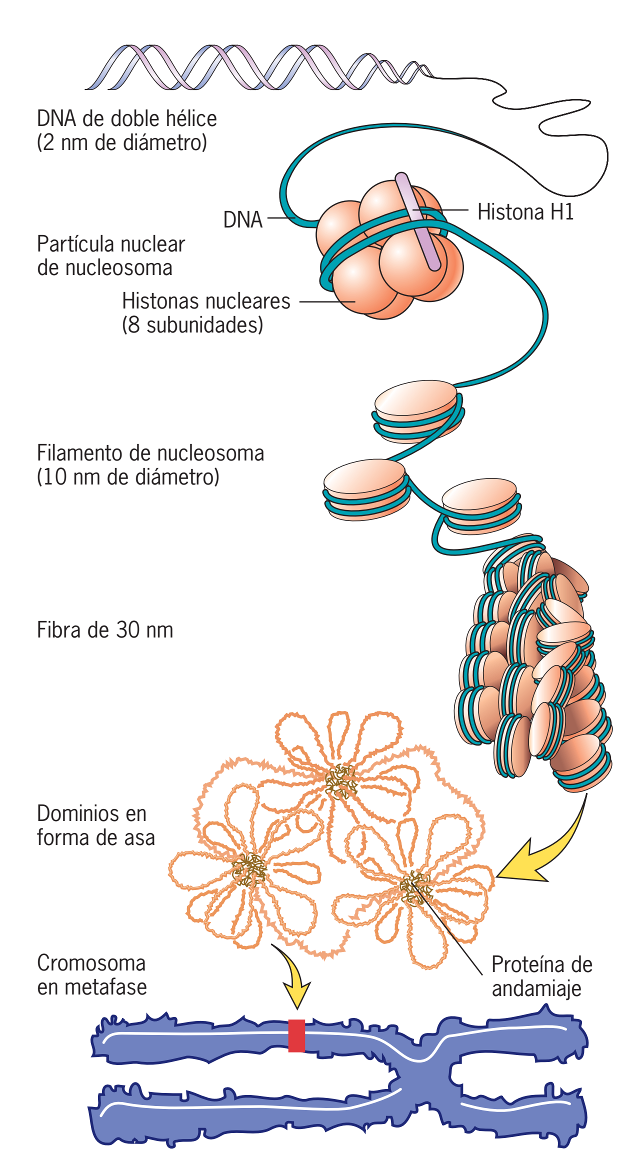


FIGURA 12-13 Niveles de organización de la cromatina. Moléculas de DNA desnudo embobinadas alrededor de las histonas para formar nucleosomas, que representan el nivel más bajo de organización de la cromatina. Los nucleosomas se organizan en fibras de 30 nm, que a su vez lo hacen en dominios de asas. Cuando las células se preparan para la mitosis, las asas se compactan aún más y forman los cromosomas mitóticos (véase fig. 14-13).

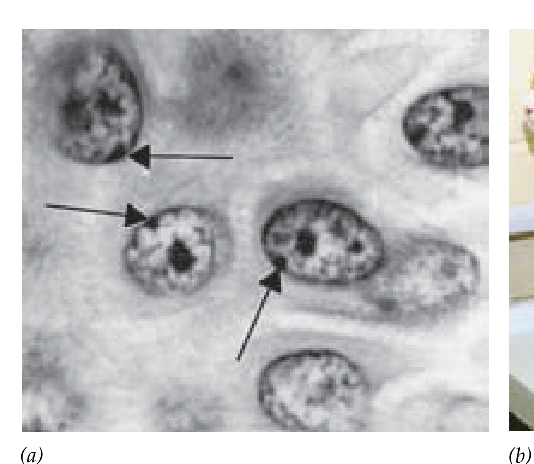
Los cromosomas mitóticos representan la última etapa del empaquetamiento de la cromatina; un cromosoma mitótico de 1 μm de longitud suele contener cerca de 1 cm de DNA, lo que representa una relación de empaquetamiento de 10 000:1. Esta compactación ocurre por un proceso que aún no está bien comprendido, y se discute en la sección 14.2. La figura 12-13 presenta una revisión de varios niveles de organización de la cromatina, desde el filamento nucleosómico al cromosoma mitótico.

Heterocromatina y eucromatina Una vez que la mitosis termina, la mayor parte de la cromatina de los cromosomas mitóticos que se encuentran compactados regresa a su condición difusa de la interfase. Sin embargo, por lo general cerca de 10% de la cromatina permanece en forma condensada o compactada durante la interfase. Esta cromatina compactada y teñida de forma densa puede apreciarse en la periferia del núcleo en la figura 12-1*a*. La cromatina que se mantiene compactada durante la interfase se conoce como **heterocromatina** para distinguirla de la **eucromatina**, que retorna al estado disperso. Cuando se alimenta a las células con el precursor de RNA uridina [H^3] radiactiva que marca el RNA, que después se fija, secciona y autorradiografía, los grumos de heterocromatina permanecen sin marca, lo que indica que tienen poca o ninguna actividad transcripcional. El estado de una región particular del genoma, sea eucromática o heterocromática, es heredado de manera estable de una generación celular a la siguiente.

La heterocromatina se divide en dos clases. La **heterocromatina constitutiva** permanece en el estado compactado en todas las células durante todo el tiempo y por tanto representa el DNA permanentemente silenciado. En las células de mamífero, la mayor parte de la heterocromatina constitutiva se encuentra en la región que flanquea los telómeros y el centrómero de cada cromosoma y un poco en otros sitios, como la parte distal del brazo del cromosoma Y, en los machos de mamífero. El DNA de la heterocromatina constitutiva consiste sobre todo en secuencias repetidas (pág. 404) y contiene hasta cierto punto pocos genes. De hecho cuando los genes que en condiciones normales son activos se mueven a una posición adyacente de la heterocromatina (tales cambios de posición son resultado de transposición o translocación), tienden a silenciarse desde el punto de vista transcripcional, un fenómeno conocido como *efecto de posición*. Se cree que la heterocromatina contiene componentes cuya influencia puede propagarse cierta distancia hacia afuera y afectar los genes cercanos. Al parecer, la diseminación de la heterocromatina a lo largo de los cromosomas es bloqueada por secuencias barrera especializadas (*elementos de frontera*) en el genoma, por la presencia de cromatina que contiene la variante de histona H2AZ (pág. 493), o por ambas cosas.

A diferencia de la variedad constitutiva, la **heterocromatina facultativa** es una cromatina que se inactiva de manera específica durante ciertas fases de la vida de un organismo o en ciertos tipos de células diferenciadas (como en la figura 17-8*b*). Un ejemplo de heterocromatina facultativa puede observarse al comparar células de hembra de mamífero con células de macho. Las células de los machos tienen un pequeño cromosoma Y y un cromosoma X mucho más grande. Como los cromosomas X y Y tienen pocos genes en común, los machos poseen una sola copia de la mayor parte de los genes que se portan en los cromosomas sexuales. Aunque las células de las hembras contienen dos cromosomas X, sólo uno de ellos ejerce actividad transcripcional. El otro cromosoma X permanece condensado como un cúmulo de heterocromatina (fig. 12-14*a*) que se denominó *corpúsculo de Barr* en honor del investigador que lo descubrió en 1949. La formación del corpúsculo de Barr asegura que las células tanto de hembras como de machos tengan el mismo número de cromosomas X activos y por tanto sinteticen cantidades equivalentes de productos codificados por los genes que están incluidos en el cromosoma X.

Inactivación del cromosoma X Con base en sus estudios de la herencia del color del pelaje en el ratón, la genetista británica Mary Lyon, en 1961 propuso lo siguiente:


(a)

(b)

(c)

FIGURA 12-14 El cromosoma X inactivo: un ejemplo de heterocromatina facultativa. *a*) La inactivación del cromosoma X en el núcleo de las células de una mujer aparece como una estructura heterocromática teñida con tono oscuro, llamada corpúsculo de Barr (flechas). *b*) Gato manchado. La inactivación aleatoria de cualquier cromosoma X en diferentes células durante el desarrollo temprano del embrión crea un mosaico de manchas de tejido. Cada mancha comprende los descendientes de una sola célula que estuvo presente en el embrión en el momento de la inactivación. Los parches son evidentes en los gatos con manchas, que son heterocigotos y tienen un alelo para el color negro que reside en uno de los cromosomas X y un alelo para el color naranja en el otro cromosoma X. Esto explica por qué casi no existen gatos con manchas: todas las células en el macho son ya sea blancas o naranjas en el color de su pelaje por el alelo que poseen. (Las manchas blancas de este gato se deben a un diferente gen que determina el color del pelaje.) *c*) Este gatito fue clonado del que se muestra en *b*. Ambos son genéticamente idénticos pero tienen distintos patrones de pelaje, un hecho que refleja la naturaleza aleatoria del proceso de desactivación de cromosomas X. (*A*, CORTESÍA DE MURRAY L. BARR; *B Y C*, CORTESÍA DEL COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE AND BIOMEDICAL SCIENCES, TEXAS A&M UNIVERSITY.)

1. La heterocromatización del cromosoma X en hembras de mamíferos ocurre durante la fase temprana del desarrollo embrionario y conduce a la inactivación de los genes en ese cromosoma.
2. La heterocromatización en el embrión es un proceso aleatorio en el sentido de que los cromosomas X que derivan del padre y los cromosomas X que derivan de la madre permanecen con igual probabilidad de convertirse en inactivos en *cualquier célula determinada*. En consecuencia, en el tiempo de la inactivación, el X paterno puede inactivarse en una célula del embrión y el X materno puede hacerlo en una célula vecina. Una vez que se ha desactivado un cromosoma X, su estado heterocromático se transmite a través de muchas divisiones celulares, de modo que el mismo cromosoma X es inactivo en todas las descendientes de esa célula en particular.
3. La reactivación del cromosoma X heterocromatizado tiene lugar en células germinales antes del inicio de la meiosis. En consecuencia los cromosomas X son activos durante la oogénesis y todos los gametos reciben un cromosoma X eucromático.

La hipótesis de Lyon se confirmó pronto.[1] Puesto que los cromosomas X tanto paternos como maternos pueden tener alelos diferentes para el mismo rasgo, las hembras adultas son en un sentido *mosaicos genéticos*, en los que alelos diferentes funcionan en células distintas. El mosaicismo del cromosoma X se refleja en la coloración en parches del pelaje de algunos animales, inclusive los gatos con manchas (fig. 12-14*b*, *c*). Como los genes de la pigmentación en humanos no se localizan en el cromosoma X, en ellos no se observa el fenómeno de "mujeres con manchas". No obstante, el mosaicismo que se debe a la inactivación del cromosoma X puede demostrarse en mujeres. Por ejemplo, si un rayo angosto de luz roja o verde se proyecta en los ojos de una mujer portadora heterocigótica para la ceguera al color rojo-verde, parches de células retinianas con defectos en la visión del color pueden encontrarse mezclados entre parches con visión normal.

El mecanismo que ocasiona la inactivación de X es un foco de atención desde un informe de 1992 que sugiere que la inactivación la inicia una molécula de RNA no codificante (más que una proteína), que se transcribe desde uno de los genes (llamado *XIST* en humanos) en el cromosoma X que se convierte en inactivo. El RNA de *XIST* es una transcripción muy larga (más de 17 kb de longitud), que se distingue de otros RNA no codificantes (pág. 459) que tienden a ser muy pequeños. El RNA de *XIST* no se difunde en el nucleoplasma sino que se acumula a lo largo de los cromosomas justo antes de su inactivación.[2] El gen *XIST* es necesario para iniciar la inactivación, pero no para mantenerla de una generación de la célula a la siguiente. Esta conclusión se basa en el descubrimiento de que las células tumo-

[1] La desactivación al azar de cromosomas X que se considera aquí, la cual se produce después de que el embrión se implanta en el útero, es en realidad la segunda oleada de desactivación de cromosomas X que ocurre en el embrión. La primera, que se presenta en una fase muy temprana del desarrollo, no es aleatoria sino que conduce sólo a la desactivación de cromosomas X aportados por el padre. Esta desactivación temprana de cromosomas X paternos es mantenida en las células que dan origen a tejidos extraembrionarios (p. ej., la placenta) y no se analiza en el texto (véase *Science* 303:633, 2004; *Curr. Biol.* 14:R323, 2004). La desactivación temprana de cromosomas X paternos se anula en células que dan origen a tejido embrionario, y ocurre después la desactivación al azar.

[2] Alrededor de 15% de los genes en el cromosoma escapa de la inactivación mediante un mecanismo que se desconoce. Los "escapes" incluyen genes que también están presentes en el cromosoma Y, lo que asegura que se expresen en la misma forma en ambos sexos.

rales de ciertas mujeres contienen un cromosoma X inactivado cuyo gen *XIST* se eliminó. Se cree que la inactivación del X se mantiene mediante metilación de DNA (pág. 529) y modificaciones histónicas, como se discute en la siguiente sección.

El código de histona y la formación de heterocromatina La figura 12-10*c* muestra un modelo esquemático de una partícula nuclear de nucleosoma con sus colas de histona proyectándose hacia afuera. Pero éste es sólo un retrato muy general que oculta importantes diferencias entre los nucleosomas. Las células contienen un ordenamiento destacado de enzimas que son capaces de agregar grupos químicos o removerlos de residuos de aminoácidos específicos en las colas de histona. Estos residuos que están sujetos a modificación, de manera notable por metilación, acetilación o fosforilación, están representados mediante barras de color en la figura 12-15. Hace pocos años surgió la hipótesis que se conoce como el "**código de histona**", que postula que el estado de actividad de una región de la cromatina depende de modificaciones específicas, o combinaciones de modificaciones, de las colas de histona en esa región. En otras palabras, el patrón de modificaciones que adorna las colas de histona del núcleo contiene información codificada que determina las propiedades de esos nucleosomas. Los estudios realizados hasta la fecha sugieren que las modificaciones de la cola de histona actúan principalmente como sitios de acoplamiento para reclutar un conjunto específico de proteínas no histónicas, que luego determinan las propiedades y actividades de ese segmento de cromatina.

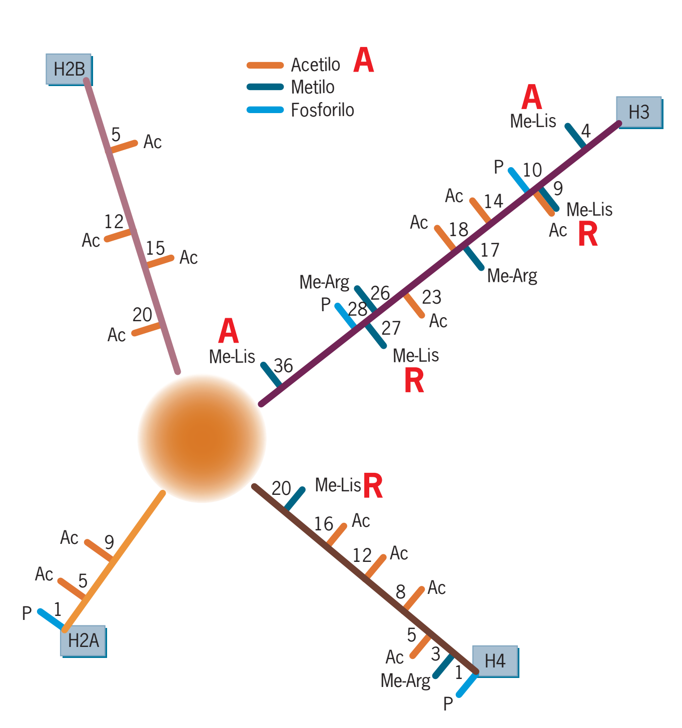


FIGURA 12-15 Modificaciones histónicas y "código histónico". Las histonas pueden modificarse enzimáticamente mediante la unión covalente de grupos fosfato, metilo y acetilo (y otros que no se explican). La ilustración indica las posiciones en las colas N-terminal de las cuatro histonas nucleares en las que cada uno de estos tres grupos puede agregarse. Los grupos metilo se agregan a residuos de arginina o lisina; los grupos acetilo, a los residuos de lisina, y los grupos fosfato, a los residuos de serina. El asunto es aún más complejo, porque cada residuo lisina puede tener uno, dos o tres grupos metilo agregados, y cada residuo arginina tener uno o dos grupos metilo agregados. Determinadas modificaciones, o combinaciones de modificaciones, se relacionan con actividades específicas de la cromatina, lo cual ha dado origen al concepto de código de histonas. Aquí la exposición se restringe a los residuos lisina, que son los mejor estudiados. Las letras rojas A y R representan activación y represión transcripcionales, respectivamente. La acetilación de lisinas en las histonas H3 y H4 se correlaciona estrechamente con la activación transcripcional. Los efectos de la metilación de las lisinas de H3 y H4 dependen en gran medida de cuál de estos residuos se modifique. Por ejemplo, la metilación de la lisina 9 de la histona H3 (esto es, H3K9) suele estar presente en la heterocromatina y se vincula con la represión transcripcional, como se expone en el texto. La metilación de H3K27 y H4K20 también se relaciona fuertemente con represión transcripcional, mientras que la metilación de H3K4 y H3K36 se vincula con activación. (*C*, TOMADA DE G. FELSENFELD & M. GROUDINE, REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE NATURE 421:450, 2003; © DERECHOS RESERVADOS 2003, MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)

Se piensa que la modificación de histona influye en la estructura y la función de la cromatina en dos niveles, al afectar: 1) el grado de compactación; en especial si una región de la cromatina es heterocromática o eucromática, y 2) la probabilidad de que un gen o un grupo de genes vaya a ser transcrito. Por el momento este texto se restringirá a la discusión del tema de la heterocromatización y el modo en que ocurre, por ejemplo, durante la inactivación del cromosoma X. Para fines prácticos se enfocará en las modificaciones de un solo residuo de aminoácido (lisina 9 de H3) que ilustra los principios generales mediante los cuales las células utilizan el código de histona. Las acciones de varias otras modificaciones de histona se indican en la figura 12-15.

La comparación de los nucleosomas presentes al interior de la heterocromatina con los dominios de la eucromatina revela grandes diferencias. El residuo de lisina en la posición número 9 (Lis9 o K9) de la histona H3 en los dominios de heterocromatina está muy metilado, mientras que este mismo residuo tiende a desmetilarse en los dominios de eucromatina, aunque puede acetilarse. La eliminación de los grupos acetilo de las histonas H3 y H4 es uno de los pasos iniciales para la conversión de eucromatina en heterocromatina. La correlación entre represión transcripcional y desacetilación de histona puede verse si se compara el cromosoma X heterocromático inactivo de las células femeninas, que contiene histonas desacetiladas, con el cromosoma X eucromático, cuyas histonas presentan un nivel normal de acetilación (fig. 12-16). La desacetilación de histonas se acompaña de la metilación de H3K9, la cual es catalizada por una enzima (una *metiltransferasa de histona*) que al parecer se dedica sólo a esta tarea. En humanos esta enzima, denominada SUV39H1, puede encontrarse al interior de la heterocromatina, donde es posible que estabilice la naturaleza de la heterocromatina de esta región por medio de su actividad de metilación.

La formación de una lisina metilada en la posición número 9 confiere a la cola de la histona H3 una propiedad importante: la capacidad de unirse con alta afinidad a proteínas que contienen un dominio particular, llamado *cromodominio*. El genoma humano contiene por lo menos 30 proteínas con cromodominios, el mejor estudiado de éstos es la *proteína 1 heterocromática* (o *HP1*). La HP1 participa en la formación y el mantenimiento de la heterocromatina. Se piensa que una vez que la HP1 se une a una cola de H3, interactúa con otras proteínas, incluidas a) SUV39H1, la enzima que metila el residuo H3K9 y b) otras

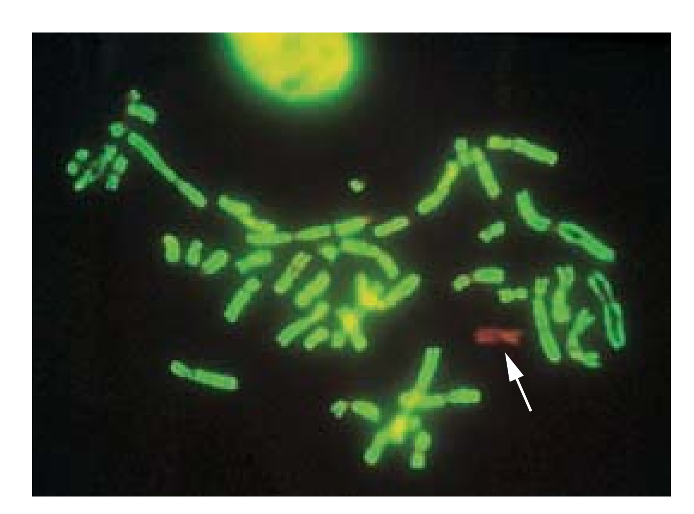


FIGURA 12-16 Demostración experimental de una correlación entre actividad transcripcional y acetilación de histona. Este frotis de cromosomas en metafase se marcó con anticuerpos fluorescentes contra histona H4 acetilada, que emite fluorescencia verde. Es evidente que todos los cromosomas excepto el cromosoma X desactivado se tiñen intensamente con el anticuerpo contra la histona acetilada. (TOMADA DE P. JEPPESEN Y B. M. TURNER, PORTADA DE CELL VOL. 74, NÚM. 2, 1993; CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS.)

moléculas de HP1 en nucleosomas cercanos. Estas propiedades de unión de la molécula de HP1 promueven la formación de una red interconectada de nucleosomas metilados, lo que conduce al dominio de cromatina compactada de un orden superior. Y lo que es más importante, este estado se transmite a través de las divisiones celulares de una generación celular a la siguiente (lo que se expone en la página 507).

Estudios realizados en varios organismos indican que los RNA pequeños, similares en naturaleza a los que participan en la interferencia de RNA (pág. 459), desempeñan una función importante en la selección de una región del genoma para que se someta a metilación histónica y heterocromatización posterior. Si, por ejemplo, los componentes de la maquinaria del iRNA se eliminan, la metilación de H3 y la heterocromatización se detienen. Estos hallazgos apuntan a otras actividades de la lista creciente de funciones que los RNA no codificantes realizan. La figura 12-17 muestra un modelo de los tipos de fenómenos que tienen lugar durante la heterocromatización.

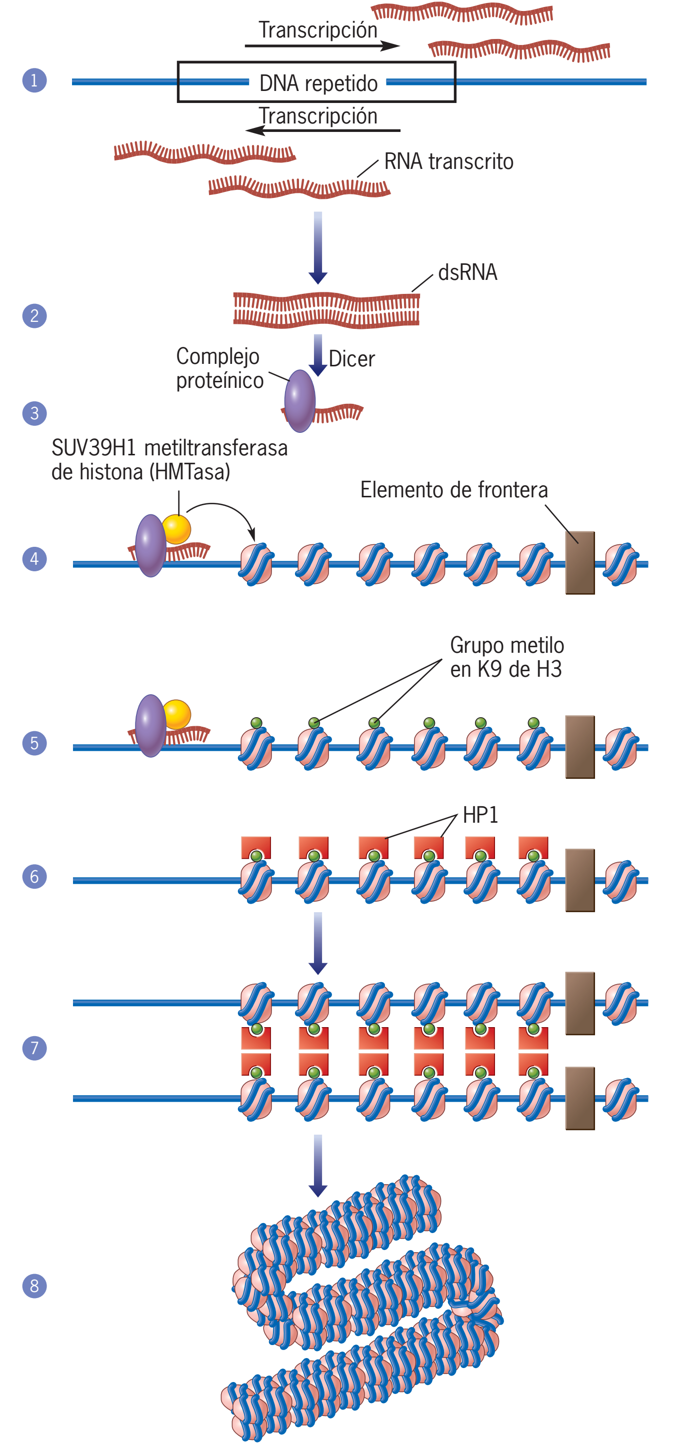


FIGURA 12-17 Modelo que muestra los fenómenos posibles durante la formación de la heterocromatina. Estudios recientes sugieren que los RNA que no codifican tienen una función importante en el control de la heterocromatización. En este modelo los RNA se transcriben de ambas cadenas de las secuencias repetidas de DNA (paso 1). Los RNA forman moléculas de doble cadena (paso 2) que son procesadas por la endonucleasa Dicer y otros componentes de la maquinaria de iRNA (pág. 460) para formar RNA monocatenario guía y un complejo proteínico relacionado (paso 3). En el paso 4, el RNA ha reclutado la enzima SUV39H1 llamada HMTasa, que es guiada a una porción de la cromatina que se encuentra en estado de eucromatina. Una vez ahí, la HMTasa cataliza la adición de grupos metilo al residuo K9 de las histonas centrales H3 (paso 5), que sirven como sitios de unión para la proteína HP1 (paso 6). El elemento de frontera en el DNA impide que la heterocromatización se disemine a las regiones adyacentes de cromatina. Una vez que HP1 se ha unido a las colas de histona, la cromatina puede empacarse en estructuras más compactas de orden superior mediante la interacción entre las moléculas proteínicas de HP1 (paso 7). La enzima SUV39H2 también puede unirse a las colas de histona metilada (no se muestran) de modo que nucleosomas adicionales pueden metilarse. En el paso 8 se forma una región de heterocromatina altamente compactada (Nota: la HP1 puede estar presente como isoformas con propiedades muy diferentes.)

Pipeta capilar con bulbo

Gota de sangre

Transferencia a un vial para cultivo

Medio de cultivo (incluye sustancia que estimula la mitosis en leucocitos)

Cultivar 72 h, luego agregar colquicina por 30 min a 3 h. Colectar las células por centrifugación

Medio

Células

Lavado con medio fresco. Añadir solución hipotónica a las células. Permitir incubar por 10 min. Remover sobrenadante y agregar medio de fijación frío (3:1 metanol:ácido acético). Incubar durante 30 min en frío, luego someter a rotura a las células

Células en suspensión

Gotear las células con el fijador

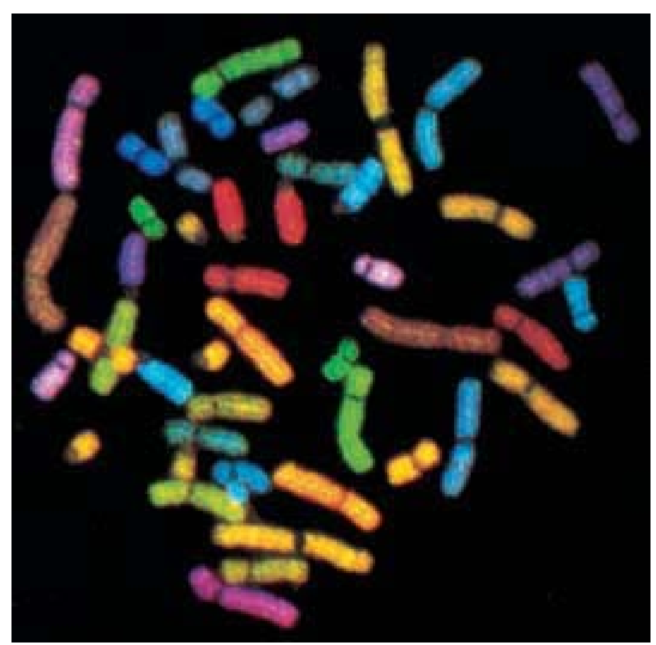
Portaobjetos húmedo

Evaporar fijador. Teñir portaobjetos

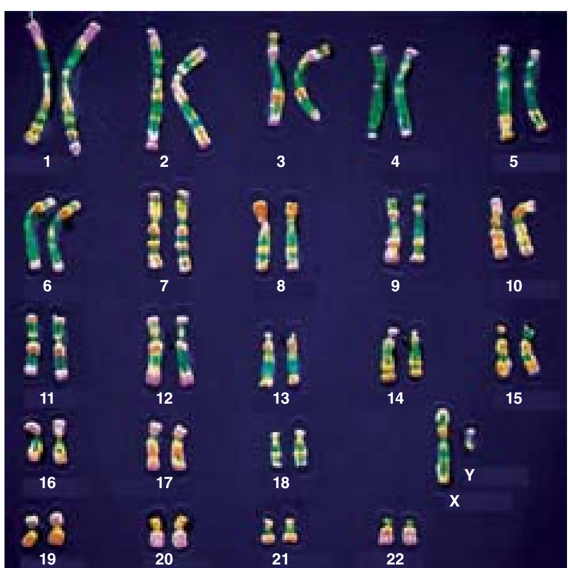
Portaobjetos

Sitio que contiene los cromosomas liberados de un solo núcleo

(a)



(b)



(c)

FIGURA 12-18 Cromosomas mitóticos y cariotipos humanos. *a*) Procedimiento utilizado a fin de obtener preparaciones de cromosomas mitóticos para observaciones microscópicas de leucocitos de sangre periférica. *b*) Fotografía de un grupo de cromosomas mitóticos obtenidos a partir de la división de un núcleo de una célula humana. El DNA de cada cromosoma se hibridó con una variedad de sondas de DNA unidas de manera covalente a dos o más colorantes fluorescentes. Diferentes cromosomas se unen en distintas combinaciones con estos colorantes y en consecuencia emiten luz de diferentes longitudes de onda. El espectro de emisión de los diversos cromosomas se convierte en combinaciones distintas de colores con un programa de computadora. Los pares homólogos de cromosoma pueden identificarse mediante el análisis de los cromosomas del mismo color y tamaño. *c*) Los cromosomas teñidos de un varón humano se ordenan en un cariotipo. Los cariotipos se preparan para obtener una fotografía de cromosomas liberados de un solo núcleo. Cada cromosoma se elimina de la fotografía y los homólogos se acomodan en pares de acuerdo con su tamaño, como se muestra. (*B*, TOMADA DE E. SCHRÖCK, ET AL., CORTESÍA DE THOMAS RIED, SCIENCE 273:495, 1996; © DERECHOS RESERVADOS 1996, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE; *C*, TOMADA DE CNRI/SCIENCE PHOTO LIBRARY/PHOTO RESEARCHERS.)

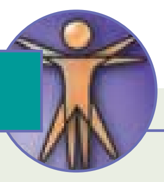
La estructura de un cromosoma mitótico El estado hasta cierto punto disperso de la cromatina de una interfase celular favorece las actividades en la interfase, como la replicación y la transcripción. En cambio, la cromatina de una célula mitótica se encuentra en un estado muy condensado, que favorece la liberación de un DNA intacto "empaquetado" a cada célula hija. Los cromosomas mitóticos son de utilidad para los biólogos y los médicos porque contienen un grupo complejo de material genético de una célula y pueden hacerse visibles mediante técnicas simples.

Cuando un cromosoma experimenta compactación durante la profase mitótica, adopta una forma distinta y predecible determinada sobre todo por la longitud de la molécula del DNA en cada cromosoma y la posición del centrómero (se explica más adelante). Los cromosomas mitóticos de una célula en división pueden visualizarse con la técnica que se ilustra en la figura 12-18*a*. En esta técnica una célula en división se somete a rotura y los cromosomas mitóticos del núcleo celular se diseminan y fijan a una superficie de un portaobjetos sobre un área pequeña (como en la figura 12-18*b*). Los cromosomas que se muestran en la figura 12-18*b* se prepararon con una metodología de tinción en la que las preparaciones cromosómicas se incuban con sondas fluorescentes de DNA de colores distintos que se unen de manera muy específica a cromosomas particulares. Por medio de diferentes combinaciones de sondas de DNA y de técnicas de visualización asistidas por computadora, cada cromosoma puede "pintarse" con un "color virtual" distinto, lo que permite que cualquier ojo entrenado los identifique. Además de la imagen a color que proporciona, esta técnica aporta también la resolución que facilita a los genetistas clínicos distinguir aberraciones cromosómicas que de otra forma se ignorarían (véase la figura 2 en Perspectiva humana).

Si los cromosomas individuales se eliminan de una fotografía como la de la figura 12-18*b*, pueden formar pares con sus cromosomas homólogos (23 pares en humanos) y ordenarse según su tamaño de mayor a menor como se ilustra en la figura 12-18*c*. Una preparación de este tipo se conoce como **cariotipo**. Los cromosomas que se muestran en el cariotipo de la figura 12-18*c* se prepararon mediante un procedimiento de tinción que confiere una apariencia de bandeo a los cromosomas. El patrón de estas bandas es muy característico de cada cromosoma de cada especie y da la pauta para identificar cromosomas y compararlos con especies distintas (véase la figura 3 en Perspectiva humana).

Los cariotipos se preparan de manera rutinaria a partir de cultivos de células humanas y se utilizan para examinar a individuos con anomalías cromosómicas. Como se señala en Perspectiva humana, con estas técnicas pueden detectarse alteraciones del tipo de cromosomas adicionales, cromosomas con alteraciones o ausencia de éstos.

PERSPECTIVA HUMANA

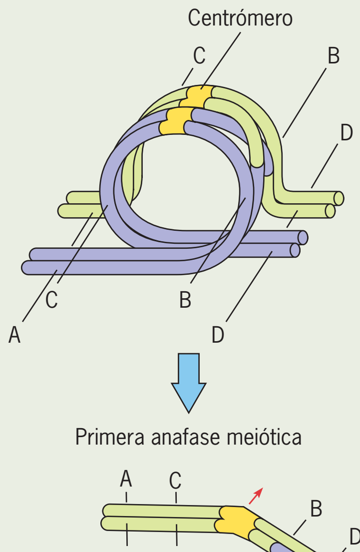


Aberraciones cromosómicas y enfermedades humanas

Además de las mutaciones que alteran la información contenida en un solo gen, los cromosomas pueden experimentar alteraciones mucho mayores, que ocurren con más frecuencia durante la división celular. Las piezas de un cromosoma pueden perderse o segmentos enteros intercambiarse entre cromosomas diferentes. La incidencia de aberraciones cromosómicas como la rotura se incrementa por exposición a agentes que dañan el DNA, como infecciones víricas, rayos X o reactivos químicos. Aunado a lo anterior, los cromosomas de algunos individuos contienen sitios "frágiles" que son en particular susceptibles a la rotura. Las personas con ciertos trastornos hereditarios raros, como el síndrome de Bloom, la anemia de Fanconi y la ataxia-telangiectasia, tienen cromosomas inestables con una gran tendencia a sufrir roturas cromosómicas.

Las consecuencias de una aberración cromosómica dependen de los genes que se afectan y el tipo de célula en la que esta alteración se presenta. Si la aberración ocurre en una célula somática (no reproductiva), las consecuencias suelen ser mínimas porque pocas células del cuerpo se afectan. No obstante, en raras ocasiones es posible que una célula somática con una aberración se convierta en una célula maligna, que puede crecer hacia un tumor canceroso. Las alteraciones cromosómicas que ocurren durante la meiosis (en especial como resultado de un mecanismo de entrecruzamiento anormal) pueden transmitirse a la generación siguiente. Cuando un cromosoma aberrante se hereda a través de un gameto, todas las células del embrión tendrán la aberración, que suele ocasionar la muerte durante el desarrollo. Los diversos tipos de aberraciones cromosómicas incluyen los siguientes:

- **Inversiones.** Algunas veces un cromosoma se rompe en dos lugares y los segmentos entre las roturas se reúnen en los cromosomas con una orientación inversa. Esta aberración se denomina inversión. Más de 1% de los humanos porta una inversión que puede detectarse durante la determinación del cariotipo cromosómico (véase fig. 10-30*b*). Un cromosoma que porta una inversión casi siempre contiene todos los genes de un cromosoma normal y por tanto el individuo no se afecta de manera adversa. Sin embargo, si la célula con una inversión cromosómica entra en meiosis, el cromosoma aberrante no puede aparearse de modo correcto con su pareja homóloga a causa de diferencias en el orden de sus genes. En tales casos el apareamiento cromosómico suele acompañarse de un asa (fig. 1). Si el entrecruzamiento ocurre dentro del asa, como se muestra en la figura, los gametos que se generan por meiosis pueden adquirir una copia adicional de ciertos genes (duplicación) o perder esos genes (una deleción). Cuando un gameto que contiene un cromosoma alterado se fusiona con un gameto normal en la fertilización, el resultado es un cigoto que tiene un desbalance cromosómico y casi nunca es viable.
- **Translocaciones.** Cuando todo o una parte de un cromosoma se une a otro cromosoma, la aberración se conoce como transloca-



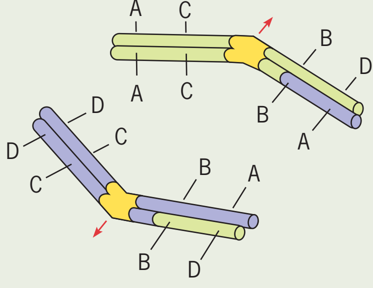


FIGURA 1 Efecto de la inversión. El entrecruzamiento entre un cromosoma normal (púrpura) y uno que contiene una inversión (verde) suele acompañarse de la formación de un asa. Los cromosomas que resultan del entrecruzamiento contienen duplicaciones y deficiencias que se muestran en los cromosomas en la primera división meiótica en la parte inferior de la figura.

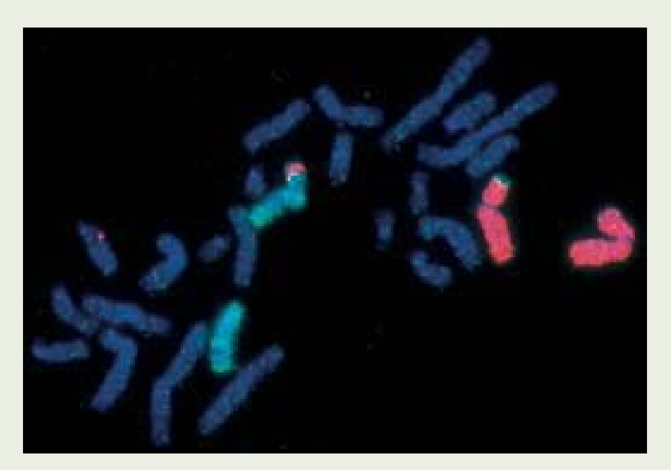


FIGURA 2 Translocación. Esta micrografía muestra un grupo de cromosomas humanos en los que el cromosoma 12 (azul brillante) intercambió piezas con el cromosoma 7 (rojo). El cromosoma afectado se tiñó con fluorescencia por hibridación in situ con fragmentos largos de DNA que son específicos para uno de los dos cromosomas. El uso de estos "medios de tinción" hace muy evidente cuando un cromosoma cambió piezas con otro cromosoma. (Cortesía de Lawrence Livermore National Laboratory, de una técnica desarrollada por Joe Gray y Dan Pinkel.)

ción (fig. 2). De modo similar a las inversiones, por lo general una translocación que ocurre en una célula somática tiene poco efecto en la función de la célula o su progenie. Sin embargo, ciertas translocaciones incrementan la probabilidad de que la célula se convierta en maligna. El ejemplo mejor estudiado es el cromosoma Philadelphia, que se encuentra en las células malignas (pero no en las normales) de individuos con ciertas formas de leucemias. El cromosoma Philadelphia, que recibe su nombre de la ciudad donde se descubrió en 1960, es una versión corta del cromosoma humano 22. Por años se pensó que el segmento perdido representaba una simple deleción, pero las mejoras en las técnicas para visualizar cromosomas permitieron detectar que el pedazo o fragmento genético perdido se encontraba translocado en otro cromosoma (número 9). El cromosoma número nueve contiene un gen (*ABL*) que codifica una proteína cinasa que desempeña una función en la proliferación celular. Como resultado de esta translocación un pequeño extremo de esta proteína es remplazado por alrededor 600 aminoácidos adicionales codificados por un gen (*BCR*) que proviene de la pieza translocada del cromosoma número 22. Esta "proteína de fusión" nueva retiene la actividad catalítica de la proteína original Abl pero no está sujeta a los mecanismos normales de regulación celular. Como resultado la célula afectada se convierte en maligna y causa la leucemia mielógena crónica (*CML*).

Como las inversiones, las translocaciones causan problemas durante la meiosis. Un cromosoma alterado por translocación tiene un contenido de información genética diferente al de su homólogo. En consecuencia los gametos que se forman por meiosis tienen un contenido adicional de copias de genes o pierden genes. Está demostrado que las translocaciones desempeñan una función importante en la evolución al generar cambios a gran escala que pueden ser el inicio de la separación de líneas evolutivas a partir de un ancestro común. Es probable que tales incidentes genéticos ocurrieran durante la historia evolutiva reciente. Una comparación de los 23 pares de cromosomas de las células humanas con los 24 pares de cromosomas de las células de chimpancés, gorilas y orangutanes revela una gran similitud. El examen detallado de los dos cromosomas de simios que no tienen su contraparte en los humanos muestra que juntos son equivalentes, banda por banda, al cromosoma humano número 2 (fig. 3). En algún punto durante la evolución de los humanos al parecer un cromosoma entero se translocó a otro, lo que creó un solo cromosoma fusionado y redujo el número haploide de 24 a 23 cromosomas.

- **Deleciones.** Una deleción ocurre cuando una porción de un cromosoma se pierde. Como se señala en el párrafo anterior, los cigotos que contienen deleciones cromosómicas se generan cuando uno de los gametos es el producto de una meiosis anormal. El renunciar a una porción de un cromosoma a menudo resulta en la pérdida de genes críticos y produce consecuencias graves, inclusive si el cromosoma homólogo del individuo es normal. La mayoría de los embriones humanos que portan una deleción importante no se desarrolla a término y si lo hace presenta una gran variedad de malformaciones. La primera correlación entre una alteración humana y una deleción cromosómica la estableció en 1963 Jerome Lejeune, un genetista francés que descubrió las bases cromosómicas del síndrome de Down. Lejeune descubrió que un niño que nació con una malformación facial había perdido una porción del cromosoma 5. Un defecto en la laringe (el órgano de la voz) ocasiona que el llanto del lactante se asemeje al sonido de sufrimiento de un gato. En consecuencia los científicos denominaron a este trastorno síndrome de cri-du-chat, que significa síndrome de maullido de gato.

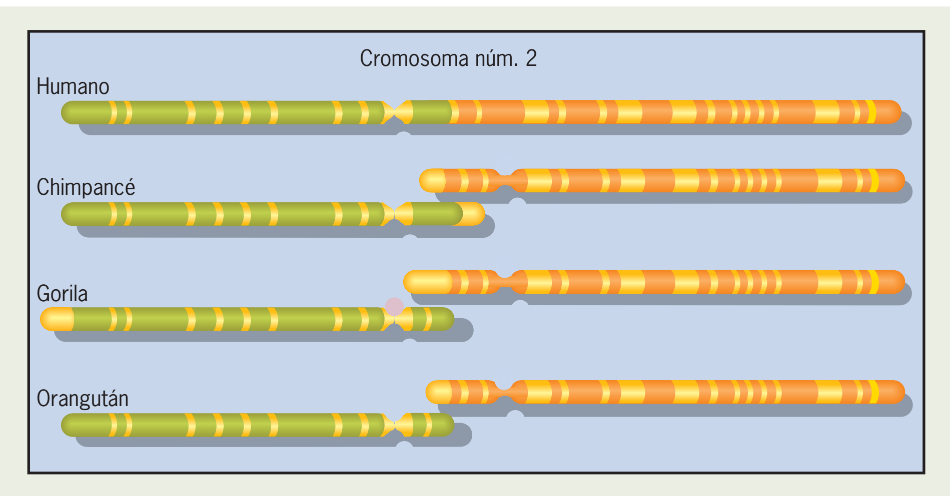
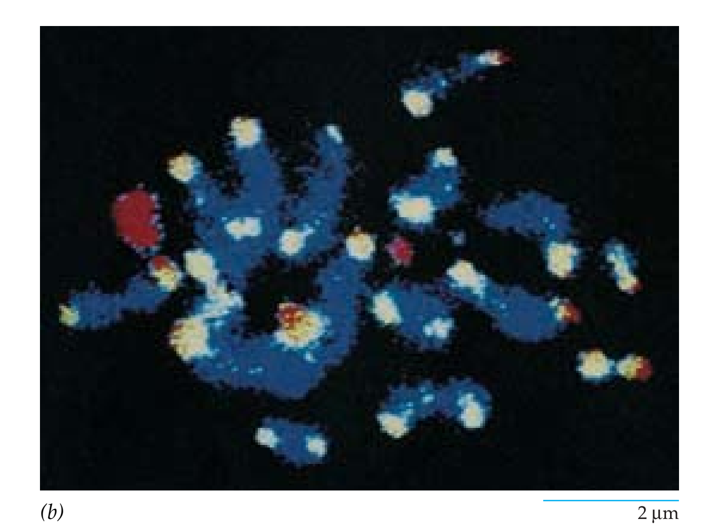


FIGURA 3 **Translocación y evolución.** Si los dos tipos de cromosomas simianos que no tienen una contraparte en las uniones se fusionaran hipotéticamente, formarían el cromosoma humano número 2, banda por banda.

- **Duplicaciones.** Una duplicación tiene lugar cuando una porción de un cromosoma se repite. La función de las duplicaciones en la formación de familias multigénicas se discutió en la página 410. Las duplicaciones cromosómicas más sustanciales crean una alteración en la que un número de genes se presenta en tres copias en lugar de las dos copias normales (el trastorno se conoce como *trisomía parcial*). Las actividades celulares son muy sensibles al número de copias de genes y las copias adicionales pueden tener efectos deletéreos graves.

Telómeros Cada cromosoma contiene una sola molécula de DNA de doble cadena. Las puntas de cada molécula de DNA están compuestas por un inusual tramo de secuencias repetidas llamado **telómero**, que forma una cubierta en cada extremo del cromosoma. Los telómeros humanos contienen una secuencia TTAGGG/AATCCC que se repite aproximadamente 500 a 5 000 veces (fig. 12-19*a*). A diferencia de casi todas las secuencias repetidas que varían de manera considerable entre diferentes especies, la misma secuencia telomérica se encuentra en los vertebrados y secuencias similares se describen en la mayoría de otros organismos. Esta similitud en secuencia sugiere que los telómeros

(*a*)



(*b*) 2 µm

FIGURA 12-19 **Telómeros.** *a*) Hibridación in situ con una sonda de DNA que contiene la secuencia TTAGGG, que se localiza en los telómeros de los cromosomas humanos. *b*) Demostración de que ciertas proteínas se unen de manera específica al DNA telomérico. Estos cromosomas se prepararon a partir de un núcleo meiótico de una célula de levadura y se incubaron con la proteína RAP1, que después se localizó en los telómeros mediante un anticuerpo fluorescente anti-RAP1. Las áreas azules indican la tinción de DNA, las áreas amarillas representan el anticuerpo marcado dirigido contra RAP-1 y las rojas muestran el RNA teñido con yoduro de propidio. Los humanos poseen una proteína telomérica homóloga. (*A*, TOMADA DE J. MEYNE, EN R. P. WAGNER, CHROMOSOMES: A SYNTESIS. © DERECHOS RESERVADOS 1993. REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE WILEY-LISS, INC., UNA SUBSIDIARIA DE JOHN WILEY & SONS, INC.; *B*, TOMADA DE FRANZ KLEIN ET AL., J CELL BIOL 117:940, 1992, CORTESÍA DE SUSAN M. GASSER. MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

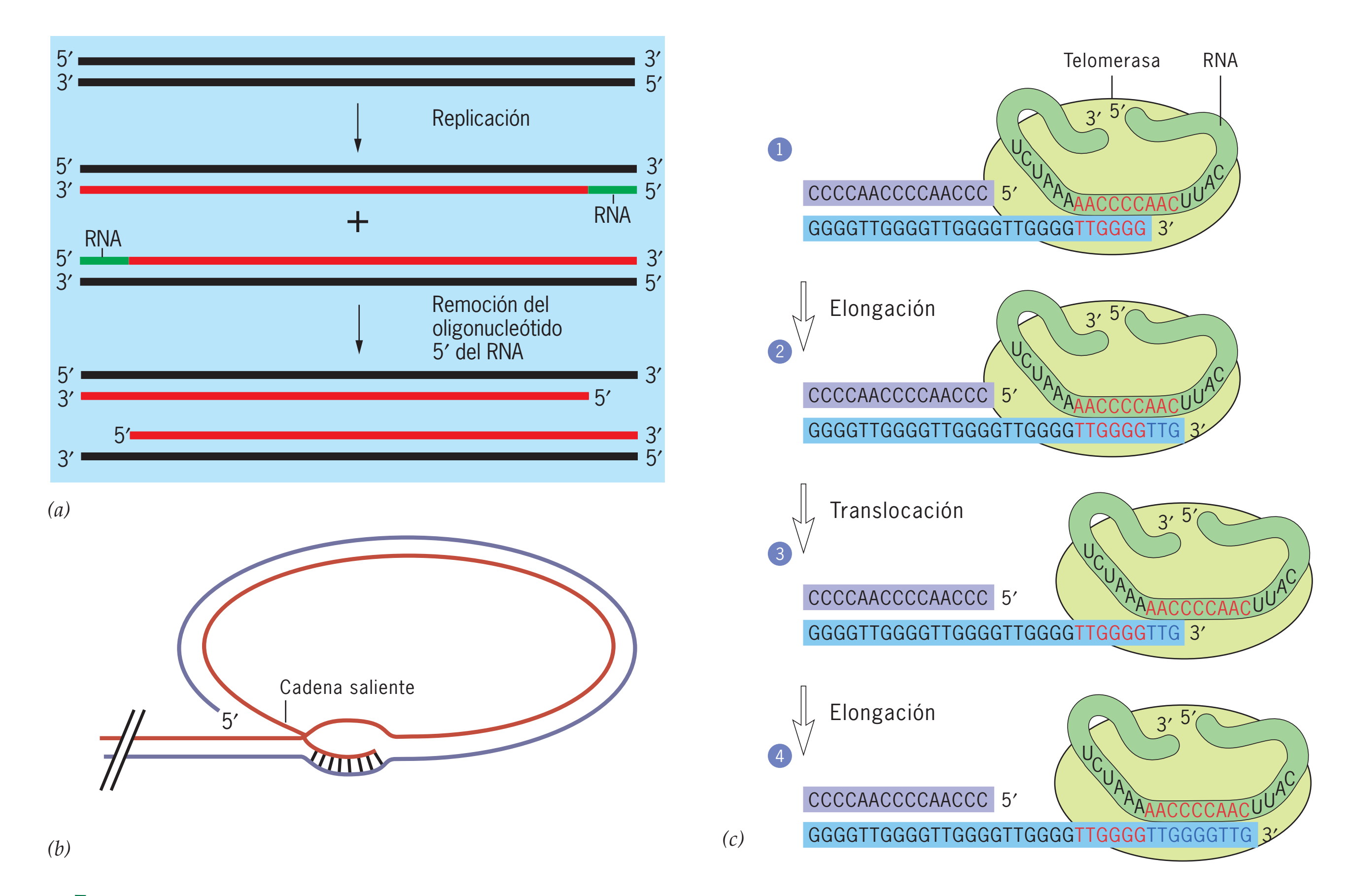


FIGURA 12-20 El problema del extremo de replicación y la función de la telomerasa. *a*) Cuando el DNA de un cromosoma se replica, los extremos 5′ de las cadenas recién sintetizadas (rojo) contienen un segmento corto de RNA (verde), que funcionó como un iniciador para la síntesis del DNA. Una vez que este RNA se elimina, el extremo 5′ del DNA se acorta de nuevo en relación con el de la generación previa. (Véase en *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 4:948, 2003 y *Mol. Cell* 18:147, 2005 una exposición amplia del problema de la duplicación del extremo.) *b*) La saliente monocatenaria no permanece como una extensión libre, sino que invade el dúplex como se muestra aquí, desplazando una de las cadenas, que forma un asa. El asa es un sitio de unión para un grupo de proteínas específicas que cortan el telómero. *c*) Mecanismo de acción de la telomerasa. La enzima contiene una molécula de RNA que es complementaria al extremo de la cadena rica en G, que se extiende más allá la cadena rica en C, formando una saliente. La telomerasa de RNA se une al extremo saliente de la cadena rica en G (paso 1) y luego sirve como una plantilla para la adición de nucleótidos en el extremo 3′ de la cadena (paso 2). Después de que se sintetiza un segmento de DNA, la telomerasa de RNA se desliza al nuevo extremo de la cadena en elongación (paso 3) y sirve como plantilla para la incorporación de dinucleótidos adicionales (paso 4). El hueco en la cadena complementaria es llenado por la maquinaria de duplicación ordinaria de la célula. (La secuencia TTGGGG ilustrada en este dibujo es la del protista ciliado *Tetrahymena*, que es el organismo en que se descubrió la telomerasa.) (*C*, tomada de C. W. Greider y E. H. Blackburn, reimpresa con autorización de Nature 337:336, 1989; © copyright 1989, Mac-millan Magazines Limited.)

tienen una función conservada en diversos organismos. Se identifican diferentes proteínas de unión a DNA que se enlazan en forma específica con la secuencia telomérica y son esenciales para la función telomérica. La proteína unida a los cromosomas en la figura 12-19*b* tiene una participación importante en la regulación de la longitud del telómero en levaduras.

Como se explica en el capítulo 13, las polimerasas de DNA que replican el DNA no inician la síntesis de una cadena de DNA sino que sólo agregan nucleótidos al extremo 3′ de una cadena existente. La replicación comienza en el extremo 5′ de cada cadena recién sintetizada mediante la síntesis de un fragmento corto de RNA llamado iniciador que después se retira (segmento verde en la figura 12-20*a*). A causa de este mecanismo, el extremo 5′ de cada cadena sintetizada de nuevo pierde un segmento corto de DNA que está presente en el extremo 3′ de la cadena complementaria del molde. Como resultado la cadena con el extremo 3′ sobrepasa a la cadena con el extremo 5′. Más que existir como una sola cadena de un extremo no protegido, la cadena que sobresale se "pliega sobre sí misma" en una porción de doble cadena en el telómero para formar un asa como la que se ilustra en la figura 12-20*b*. Al parecer esta conformación protege el extremo telomérico del DNA.

Si las células no fueran capaces de replicar los extremos de su DNA, se esperaría que los cromosomas fueran más cortos con cada ciclo de división celular (fig. 12-20*a*). Este predicamento se denomina "el problema de la replicación de los extremos". El principal mecanismo por el que los organismos resuelven "el problema de la replicación de los extremos" se dilucidó en 1984

cuando Elizabeth Blackburn y Carol Greider de la *University of California*, en Berkeley, descubrieron una nueva enzima, llamada **telomerasa**, que puede agregar nuevas unidades repetidas al extremo 3′ de la cadena sobresaliente (fig. 12-20*c*). Una vez que el extremo 3′ de la cadena se alarga, una polimerasa convencional de DNA puede utilizar el segmento 3′ recién sintetizado como un molde para regresar el extremo 5′ de la cadena complementaria a su longitud normal. La telomerasa es una transcriptasa inversa que sintetiza DNA mediante el uso de RNA como molde. A diferencia de la mayoría de las transcriptasas inversas, esta enzima por sí misma contiene el RNA que le sirve como molde (fig. 12-20*c*).

Los telómeros son partes muy importantes del cromosoma: se requieren para la replicación completa de los cromosomas, forman capas que protegen los cromosomas del ataque de nucleasas y otras influencias desestabilizantes, e impiden que los extremos de los cromosomas se fusionen entre sí. La figura 12-21 muestra cromosomas mitóticos de un ratón que se manipularon por medios genéticos para que carezcan de telomerasa. Muchos de esos cromosomas experimentaron la fusión de sus extremos, lo que produjo consecuencias catastróficas como la fractura de los cromosomas en las divisiones celulares subsecuentes.

Experimentos recientes sugieren funciones adicionales para los telómeros, que aún son tema de investigación.

Supóngase que un investigador toma una pequeña biopsia de su piel, aísla una población de fibroblastos de la dermis y permite que estas células crezcan en un medio de cultivo enriquecido. Los fibroblastos deben dividirse cada día en el cultivo y por último cubrir la caja de cultivo. Si una fracción de estas células se removiera de la primera caja de cultivo y se sembrara en una segunda caja de cultivo, estas células deberían proliferar otra vez y cubrir la segunda de cultivo. Aunque podría pensarse que es posible subcultivar de forma indefinida estas células (como se creyó durante la primera mitad del siglo pasado), esto es erróneo. Después de alrededor de 50 a 80 poblaciones de duplicaciones celulares, las células dejan de dividirse y al final mueren. Si la longitud promedio de los telómeros en los fibroblastos al principio y al final de los experimentos se comparara, se encontraría una disminución drástica de la longitud de los telómeros a través del tiempo de cultivo. Los telómeros se acortan porque la mayoría de las células pierde la enzima telomerasa y son incapaces de evitar la pérdida de sus extremos cromosómicos.[3] Los telómeros de los cromosomas se acortan de manera progresiva con cada división celular. El acortamiento de los telómeros continúa hasta un punto crítico, conocido como "crisis", cuando las células presentan anomalías extensas en los cromosomas y dejan de dividirse. En cambio, las células que son forzadas a expresar telomerasa continúan proliferando por cientos de divisiones más. Las células que expresan telomerasa no sólo siguen dividiéndose, sino que lo hacen sin mostrar los signos de envejecimiento fisiológico que se ven en cultivos testigos.

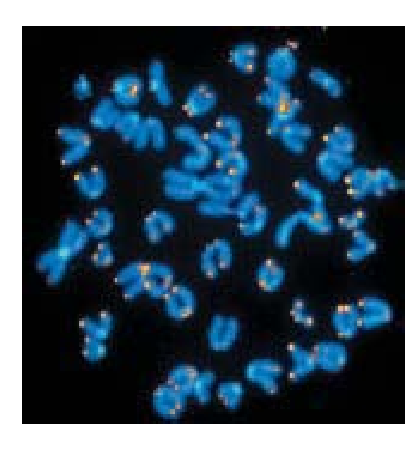


FIGURA 12-21 La importancia de la telomerasa en el mantenimiento de la integridad cromosómica. Los cromosomas de esta micrografía provienen de una célula de un ratón knockout que carece de un gen funcional para la enzima telomerasa. Los telómeros aparecen como manchas amarillas después de la hibridación in situ con una sonda telomérica fluorescente. Puede verse que algunos cromosomas pierden sus telómeros por completo y que diferentes cromosomas se fusionan uno con otro en sus extremos. La fusión de cromosomas produce cromosomas con más de un centrómero, lo que conduce a rotura cromosómica durante la división celular. La inestabilidad genética resultante de la pérdida de un telómero puede ser la causa principal de que las células se conviertan en cancerosas. (Tomada de Maria A. Blasco, et al., cortesía de Carol W. Greider, Cell, vol. 91, portada del núm. 1, 1997; con autorización de Cell Press.)

Si los telómeros son un factor tan importante para limitar el número de veces que una célula puede dividirse, podría esperarse que fueran un factor decisivo en el envejecimiento humano. De hecho, algunos estudios han sugerido que las personas mayores cuyas células tienen telómeros más cortos corren mayor riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares o contraer infecciones graves que personas de edad comparable con telómeros más largos. En otra serie de investigaciones se descubrió que el síndrome de Werner, una enfermedad hereditaria que hace que los pacientes envejezcan mucho más rápido de lo normal, se caracteriza por mantenimiento anormal de los telómeros. Incluso se ha informado que las mujeres sometidas a estrés crónico por cuidar a niños muy enfermos tienen telómeros más cortos y menor actividad de telomerasa. Antes de concluir que tener sobreactividad de telomerasa es la clave para prolongar el lapso de vida del ser humano, se debe considerar la siguiente información.

El consenso actual indica que el acortamiento de los telómeros protege al ser humano contra el cáncer al limitar el número de divisiones de una célula potencialmente tumoral. Las células malignas, por definición, son células que escaparon del control de crecimiento normal del organismo y continúan en división indefinida. ¿Cómo es que las células tumorales pueden fraccionarse de manera repetida sin llegar a la muerte celular? A diferencia de las células normales que pierden la actividad de telomerasa, cerca de 90% de los tumores humanos consiste en células que contienen enzima telomerasa activa.[4] Se especula que el crecimiento de los tumores se relaciona con una intensa selección de células en las que la expresión de la telomerasa se reactivó. Aunque casi todas las células tumorales fallan para expresar la telomerasa y mueren, las células raras que expresan

[3] Es notable que, a diferencia de las células somáticas, las células germinales de las gónadas retienen la actividad de telomerasa y los telómeros de los cromosomas no se acortan como resultado de la división celular. En consecuencia, cada descendiente comienza la vida como un cigoto que contiene los telómeros de máxima longitud.

[4] El otro 10% o más tiene un mecanismo alternativo basado en recombinación genética que mantiene la longitud de los telómeros en ausencia de telomerasa.

la enzima telomerasa se "inmortalizan". Esto no significa que la activación de la telomerasa por sí misma ocasione que las células se conviertan en malignas. Como se discute en el capítulo 16, el cáncer es un proceso de múltiples pasos en los que las células casi siempre desarrollan cromosomas anormales y cambios en la adhesión celular y la capacidad para invadir los tejidos normales. La división celular ilimitada es sólo una propiedad de las células cancerosas. De hecho cuando las células normales se fuerzan a expresar telomerasa, como se describió antes, estas células se dividen de modo indefinido pero no se transforman en células cancerosas. Si las células "normales" que expresan telomerasa se implantan en un ratón, no se desarrollan en tumores, como debería suceder si fueran cancerosas. Resulta interesante notar que los primeros descubrimientos sobre secuencias teloméricas de DNA y telomerasa se realizaron en *Tetrahymena*, la misma criatura unicelular habitante de depósitos de agua estancada en que se descubrieron las ribozimas (pág. 478). Esto sirve como otro recordatorio de que nunca se sabe cuáles vías experimentales llevarán a descubrimientos de gran importancia médica.

Centrómeros Cada centrómero que se ilustra en la figura 12-18 contiene un sitio donde la superficie externa está muy indentada. El sitio de la constricción marca el **centrómero** del cromosoma (fig. 12-22). En humanos el centrómero contiene una repetición en tándem, una secuencia de 171 pares de bases (llamada *DNA satélite alfa*) que se extiende a por lo menos 500 kilobases. Este segmento de DNA se relaciona con proteínas específicas que se distinguen de otras partes del cromosoma. Por ejemplo, la cromatina centromérica contiene una variante "especial" de histona H3, denominada CENP-A, que reemplaza la histona H3 convencional en muchos de los nucleosomas. Además la cromatina centromérica se une con proteínas específicas que sirven como sitio de unión (cinetocoros) para los microtúbulos que separan los cromosomas durante la división celular (véase fig. 14-16). Al parecer el cinetocoro ensambla el centrómero gracias a la presencia de CENP-A en el sitio. Los cromosomas que carecen de centrómero tienen problemas para ensamblarse a un cinetocoro y se pierden durante la división celular.

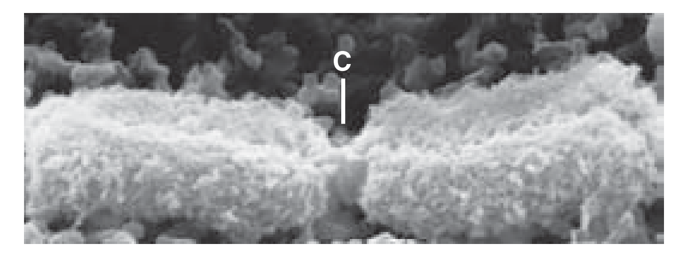


FIGURA 12-22 **Cada cromosoma mitótico tiene un centrómero cuyo sitio está marcado por una indentación distinta.** Micrografía electrónica de barrido de un cromosoma mitótico. El centrómero (C) contiene secuencias de DNA muy repetidas (DNA satélite) y una proteína que contiene una estructura denominada cinetocoro que sirve como sitio para la unión de los microtúbulos del huso acromático durante la mitosis y la meiosis (que se estudian en el capítulo 14). (Tomada de Jerome B. Rattner, Bioess 13:51, 1991.)

En capítulos previos se sugirió que las secuencias de DNA que se encargan de las funciones celulares esenciales tienden a conservarse. Por tanto, fue sorprendente descubrir que el DNA centromérico presenta diferencias marcadas en la secuencia nucleotídica, inclusive entre especies muy relacionadas.[5] Este hallazgo sugiere que la secuencia del DNA por sí misma no es un determinante de importancia de la estructura del centrómero y su función, una conclusión muy bien apoyada por los siguientes estudios en humanos. Alrededor de uno de cada 2 000 humanos nace con células que tienen una pieza de más de DNA cromosómico que forma un cromosoma diminuto adicional llamado *cromosoma marcador*. En algunos casos los cromosomas marcadores están desprovistos de DNA satélite alfa y aun contienen una constricción primaria y un centrómero por completo funcional que permite a los cromosomas duplicados separarse con normalidad en las células hijas en cada división. Es claro que algunas otras secuencias de DNA en estos cromosomas marcadores se "seleccionan" como el sitio de unión para las proteínas centroméricas. El centrómero aparece en el mismo sitio en un cromosoma marcador en todas las células de las personas, lo que indica que la propiedad se transmite a los cromosomas hijos durante la división celular. Un estudio reveló que los cromosomas marcadores se transmiten de manera estable a través de tres generaciones de miembros de una familia.

Epigenética: hay más que heredar que una secuencia de DNA

Como se describió en párrafos anteriores, el DNA satélite alfa no es necesario para el desarrollo de los centrómeros. De hecho docenas de secuencias de DNA no relacionadas se encuentran en los centrómeros de cromosomas marcadores. No es el DNA el que marca indeleblemente el sitio como un centrómero, sino la cromatina con CENP-A que contiene. Estos hallazgos dan pie a otro tema. No todas las características hereditarias dependen de las secuencias de DNA. La herencia de este tipo se refiere como herencia **epigenética** en oposición a la *genética*. La inactivación del cromosoma X que se estudia en la página 497 es otro ejemplo de un fenómeno epigenético: los dos cromosomas X pueden tener secuencias de DNA idénticas, pero uno se inactiva y el otro no. Además el estado de inactivación se transmite de una célula a sus hijas durante la vida de una persona. Sin embargo, a diferencia de la herencia genética, un estado epigenético suele revertirse; por ejemplo, los cromosomas X se reactivan antes de la formación de gametos. Los cambios inapropiados en el estado epigenético se vinculan con numerosas enfermedades. Asimismo existen indicios que sugieren que las diferencias en susceptibilidad a enfermedades y longevidad entre gemelos genéticamente idénticos pueden deberse en parte a diferencias epigenéticas que aparecen entre los gemelos a medida que envejecen.

[5] Es interesante notar que la secuencia aminoacídica de CENP-A, que se une al DNA centromérico, también varía entre organismos relacionados. Los estudios sugieren que las secuencias de DNA y de CENP-A coevolucionaron; los cambios en la secuencia de DNA condujeron a la selección de las secuencias de CENP-A que permiten a la proteína continuar uniéndose con afinidad alta al centrómero.

Aunque los biólogos han discutido los fenómenos epigenéticos por decenios, enfrentan problemas para entender sus bases y el mecanismo por el que un estado epigenético puede transmitirse de una célula a la siguiente y de padres a hijos. Considérese una célula que reside en el estrato basal de la epidermis (como en la figura 7-1). Estas células se dividen de manera muy frecuente y producen células hijas que por último se diferencian en células cornificadas de la superficie corporal. Ciertos genes en estas células tienen actividad transcripcional y otros están reprimidos, y es importante que este patrón de actividad génica característico se transmita de una célula a su descendencia. Hace poco la atención se enfocó en el código histónico (pág. 498) como un factor crítico tanto para la determinación del estado transcripcional de una región particular de cromatina como para su transmisión a las generaciones subsecuentes.

Cuando el DNA de una célula se replica, las histonas relacionadas con el DNA como parte de los nucleosomas se distribuyen al azar en las células hijas junto con las moléculas de DNA. Como resultado, cada cadena hija de DNA recibe la mitad de los núcleos de histona que estuvieron relacionados con la cadena parental (véase fig. 13-24). La otra mitad de los núcleos de histona que se vinculan con las cadenas de DNA hijas se recluta de un fondo común de moléculas de histona recién sintetizadas. Se piensa que las modificaciones presentes en las colas de histona en la cromatina parenteral determinan las modificaciones que ocurrirán en las histonas sintetizadas de nuevo en la cromatina hija.

Por ejemplo, como se revisó en la página 498, la heterocromatina tiene residuos de lisina metilados en la posición 9 de la histona H3. La enzima que se encarga de esta reacción de metilación está presente como uno de los componentes de la heterocromatina. Se piensa que conforme la heterocromatina se replica, la enzima metiltransferasa de histona metila las moléculas de histona H3 recién sintetizadas que se incorporan en los nucleosomas de las células hijas. De esta forma el patrón de metilación de la cromatina, y por tanto su estado de heterocromatina condensada, se transmite de la célula paterna a su descendencia. En cambio, las regiones de eucromatina tienden a contener colas de H3 acetilada y esta modificación también se transmite de la cromatina parenteral a la cromatina de la descendencia, lo que quizá constituya el mecanismo epigenético por el que las regiones de eucromatina activa se perpetúan en las células hijas. Las modificaciones de histona representan un portador de información epigenética y las modificaciones covalentes al DNA son otro tipo. Este último aspecto se trata en la página 529.

El núcleo como un organelo organizado

El examen del citoplasma de una célula eucariota bajo el microscopio electrónico reveló la presencia de un arreglo diverso de organelos membranosos y elementos del citoesqueleto. Por otra parte, el examen del núcleo suele mostrar cromatina dispersa y uno o más nucleolos irregulares. Como resultado los investigadores se quedaron con la impresión de que el núcleo es semejante a un "saco" de componentes posicionados al azar. El desarrollo de nuevas técnicas de microscopia, inclusive la hibridación con fluorescencia in situ (FISH, pág. 407) y las imágenes de células

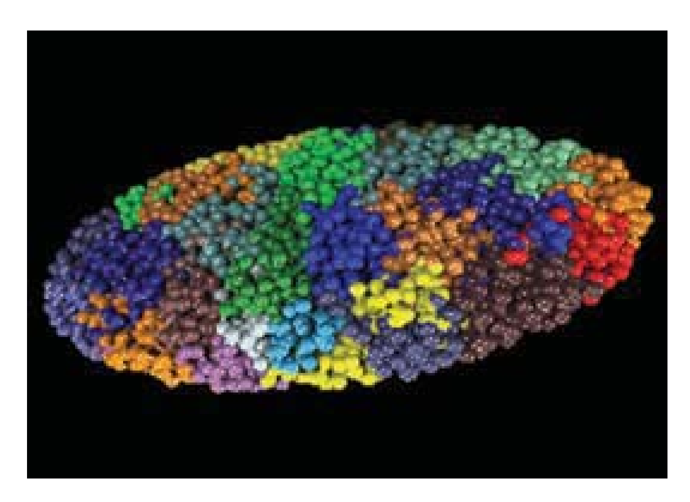


FIGURA 12-23 **Mapa tridimensional de todos los cromosomas presentes en el núcleo de un fibroblasto humano.** Imagen generada por computadora basada en análisis de hibridación in situ de fluorescencia similares al descrito en la figura 12-18*b*, que permite distinguir cada cromosoma humano de otros y representarlo mediante un color identificable. Se observa que cada cromosoma ocupa un territorio bien definido dentro del núcleo. (Tomada de Andreas Bolzer, et al., PLoS Biol. 3:E157, 2005, cortesía de Thomas Cremer.)

vivas marcadas con GFP (pág. 277), permitió localizar los loci de genes específicos dentro del núcleo de interfase. A partir de estos estudios fue evidente que el núcleo mantiene un orden considerable. Por ejemplo, las fibras de cromatina de un cromosoma en interfase no se mezclan en el núcleo como un nudo de espaguetis, más bien se concentran en un territorio distinto que no se traslapa extensamente con los territorios de otros cromosomas (fig. 12-23).

Aunque es evidente que los cromosomas ocupan distintos territorios, se ha demostrado que es posible que fibras individuales de cromatina se extiendan a distancias considerables de estos territorios. Además, genes que residen en diferentes cromosomas pero participan en el mismo proceso pueden reunirse en el núcleo, donde es posible que se transcriban de manera simultánea. Esto es ilustrado por los genes que codifican RNA ribosómico, los cuales se localizan en varios cromosomas distintos y sin embargo son capaces de converger dentro de los confines del nucleolo (pág. 438).

El análisis de las ubicaciones de cromosomas individuales en imágenes como la mostrada en la figura 12-23 sugiere que los cromosomas más pequeños y los ricos en genes tienden a residir más cerca del centro del núcleo que los más grandes o pobres en genes. Diferentes partes de los cromosomas también pueden tener localizaciones predecibles. En algunas plantas y núcleos de levadura, por ejemplo, los centrómeros heterocromáticos y los telómeros de los cromosomas parecen vincularse con la envoltura nuclear. Aunque ciertas secuencias del ácido desoxiorribonucleico pueden unirse a la envoltura nuclear, las porciones no unidas del cromosoma son capaces de moverse en forma aleatoria dentro de una zona restringida del nucleoplasma (fig. 12-24).

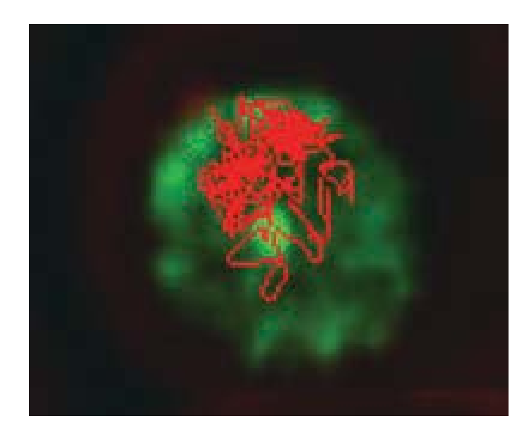


FIGURA 12-24 Dinámica de la cromatina. Micrografía de un núcleo de levadura (verde). Huella de un solo locus de cromosoma marcado con fluorescencia conforme se mueve dentro del núcleo en un periodo de 200 s en rojo. Aunque el locus es capaz de efectuar movimientos considerables, no se encuentra como un elemento libre en el núcleo sino que se constriñe como resultado de la unión del cromosoma con estructuras no cromosómicas del núcleo. Los núcleos de levadura son muy pequeños (cerca de 1/10 de tamaño de un núcleo de vertebrado), por lo que la distancia que el locus cromosómico se mueve es menor de 1 μm. (Tomada de Florence Hediger, Thierry Laroche y Susan M. Gasser, Curr Opin Cell Biol 15:152, 2003.)

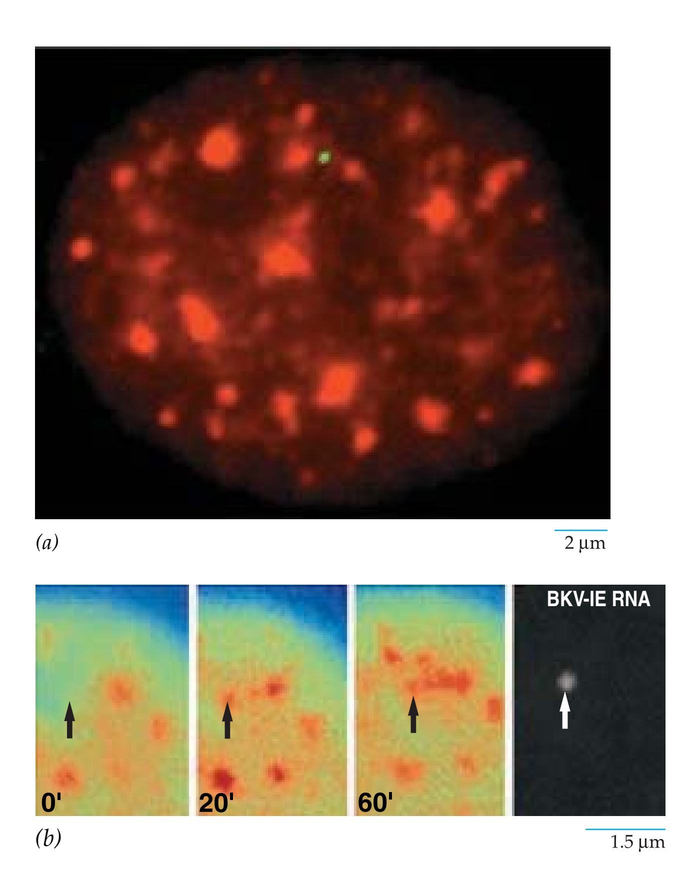
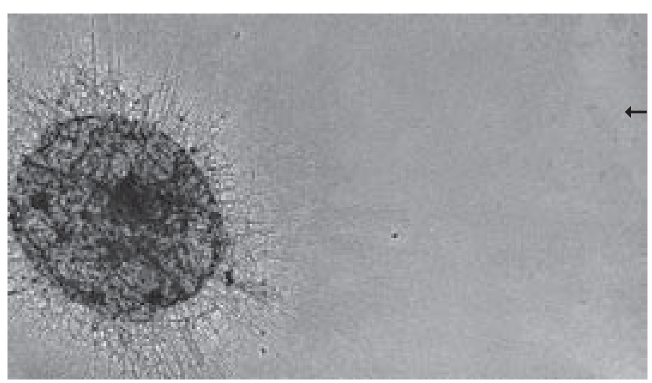


FIGURA 12-25 Compartimentalización nuclear de la maquinaria de procesamiento de los mRNA celulares. *a)* Núcleo de una célula teñido con anticuerpos fluorescentes dirigidos contra uno de los factores que participan en el procesamiento del mRNA. La maquinaria de procesamiento del mRNA se localiza en alrededor de 30 a 50 sitios discretos, o "motas". La célula que se muestra en esta micrografía se infectó con un citomegalovirus, cuyos genes (que se muestran como puntos verdes) se transcriben cerca de uno de estos dominios. *b)* Las células cultivadas se transfectaron con un virus y la transcripción se activó mediante la adición de AMP cíclico. Las imágenes se ven en varios periodos después de la activación transcripcional. El sitio de transcripción del genoma viral en esta célula se indica mediante flechas. Este sitio se reveló al final del experimento por hibridación del RNA viral a una sonda marcada con fluorescencia (indicado por la flecha blanca en el cuarto esquema). Factores de *splicing* de pre-mRNA (naranja) forman un rastro de motas en la dirección de los genes que se transcriben. (*A*, tomada de Tom Misteli y David L. Spector, Curr Opin Cell Biol 10:324, 1998; *B*, reimpresa con autorización de Tom Misteli, Javier F. Cáceres y David L. Spector, Nature) 387:525, 1997; derechos reservados 1997, Macmillan Magazines Limited.)

La figura 12-25*a* ilustra otro ejemplo de organización nuclear. Esta micrografía muestra una célula que se tiñó con un anticuerpo fluorescente dirigido contra uno de los factores proteicos que participan en el *splicing* de pre-mRNA. En lugar de diseminarse de manera uniforme en el núcleo, la maquinaria del procesamiento se concentra en 20 a 50 dominios irregulares conocidos como "motas". De acuerdo con la opinión prevaleciente, estas motas funcionan como depósitos de almacenamiento dinámico que aportan los factores de *splicing* para utilizarlos en los sitios de transcripción cercanos. La mancha verde en el núcleo de la figura 12-25*a* representa un gen vírico que se transcribe cerca de una de las motas. Las micrografías de la figura 12-25*b* muestran un rastro de factores de *splicing* que se extiende desde un dominio de mota hacia un sitio cercano donde la síntesis del pre-mRNA recién se activó. Las diversas estructuras del núcleo, entre ellas el nucleolo y las motas, son compartimientos dinámicos en estado estable cuya existencia depende de su actividad continua. Si la actividad se bloquea, los compartimientos desaparecen y sus materiales se dispersan en el nucleoplasma.

Además de los nucleolos y las motas, otros corpúsculos o cuerpos nucleares (p. ej., los corpúsculos de Cajal, las GEM y los cuerpos PML) a menudo se observan bajo el microscopio. Cada uno de estos cuerpos nucleares contiene gran número de proteínas que se mueven hacia adentro y hacia afuera de la estructura de un modo dinámico. Dado que ninguno de estos cuerpos nucleares está rodeado por membrana, no se requieren mecanismos especiales de transporte para estos movimientos a gran escala. Se han atribuido diversas funciones a estas estructuras nucleares, pero siguen siendo mal definidas. Sin embargo, no parecen ser esenciales para la viabilidad de la célula y no se les considerará más aquí.

La matriz nuclear Cuando el núcleo aislado se trata con detergentes no iónicos y ricos en sal (p. ej., 2 M de cloruro de sodio), que remueven los lípidos y casi todas las proteínas histónicas y no histónicas de la cromatina, el DNA se observa como un halo que rodea el núcleo residual (fig. 12-26*a*). Si después de que las fibras de DNA se digieran con DNasa, la estructura que permanece posee la misma forma que el núcleo original, pero se compone de una red fibrilar de proteínas delgadas que se



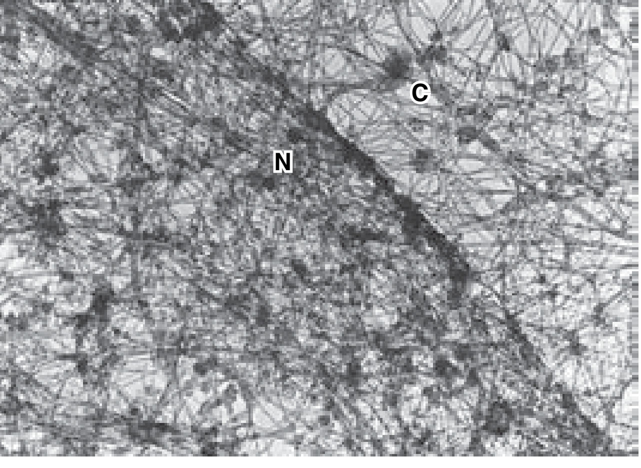


FIGURA 12-26 La matriz nuclear. *a*) Micrografía electrónica de un núcleo aislado en presencia de detergente y sal 2 M, que abandona la matriz nuclear rodeado por un halo de asas de DNA. La flecha marca el límite externo de las asas de DNA. *b*) Micrografía electrónica de una porción de un fibroblasto de ratón extraído con detergentes y desprovisto de su cromatina y DNA mediante tratamiento con nucleasas y una alta concentración de sal. Puede verse que el núcleo (N) consiste en una matriz de filamentos residuales cuyos elementos terminan en el sitio de la envoltura nuclear. El citoplasma (C) contiene una matriz de citoesqueleto diferente cuya estructura se discute en el capítulo 9. (*A*, REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE D. A. JACKSON, S. J. MCCREADY Y P. R. COOK, NATURE 292:553, 1981; © DERECHOS RESERVADOS 1981, MACMILLAN MAGAZINES LIMITED; *B*, TOMADA DE DAVID G. CAPCO, KATHERINE M. WAN Y SHELDON PENMAN, CELL 29:851, 1982; CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS.)

entrecruzan en el espacio nuclear (fig. 12-26*b*). Esta red fibrilar insoluble se denomina **matriz nuclear**. La matriz nuclear es un tema de gran controversia en la biología celular; un grupo de investigadores supone que la red de proteínas que se observa en la figura 12-26 es un artefacto de la preparación.

De acuerdo con muchas propuestas, la matriz nuclear sirve como esqueleto o andamiaje para mantener la forma del núcleo o un andamiaje en el que las asas de cromatina se organizan (pág. 495); también sirve para anclar gran parte de la maquinaria que participa en las diferentes actividades del núcleo, inclusive la transcripción, el procesamiento de RNA y la replicación. Por ejemplo, si las células se incuban con una sonda de precursores de RNA o DNA marcada con radiactividad o fluorescencia por un breve periodo, se detecta que casi todos los ácidos nucleicos sintetizados de nuevo se relacionan con estructuras fibrilares del tipo de las que se muestran en la figura 12-26.

REVISIÓN ?

1. Describa los componentes que forman la envoltura nuclear. ¿Cuál es la relación entre las membranas nucleares y el complejo del poro nuclear? ¿De qué manera el complejo del poro nuclear regula el movimiento bidireccional de materiales entre el núcleo y el citoplasma?
2. ¿Cuál es la relación entre las histonas y el DNA de una partícula nuclear de nucleosoma? ¿Cómo se reveló la existencia de los nucleosomas? ¿Cómo se organizan los nucleosomas en los niveles superiores de cromatina?
3. ¿Cuál es la diferencia en estructura y función entre la heterocromatina y la eucromatina? ¿Entre la cromatina constitutiva y la facultativa? ¿Entre un cromosoma X activo y uno inactivo en una célula de hembra de mamífero? ¿Cómo determina el código de histona el estado de una región de la cromatina?
4. ¿Cuál es la diferencia en estructura y función entre los centrómeros y los telómeros de un cromosoma?
5. Describa algunas de las observaciones que sugieren que el núcleo es un compartimiento ordenado.

12.2 CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN BACTERIAS

Una célula bacteriana vive en contacto directo con el ambiente, que puede cambiar de composición química de manera radical de un momento a otro. En cierto tiempo un compuesto particular puede estar presente, mientras que en otro es posible que esté ausente. Considérense las consecuencias de transferir un cultivo bacteriano de un medio mínimo a uno que contiene: 1) lactosa o 2) triptófano.

1. La lactosa es un disacárido (véase fig. 2-16) compuesto de glucosa y galactosa cuya oxidación puede proporcionar intermediarios metabólicos y energía a la célula. El primer paso en el catabolismo (es decir, la degradación) de la lactosa es la hidrólisis del enlace (un enlace galactósido beta) que une los dos azúcares, una reacción que la enzima galactosidasa beta cataliza. Cuando las células bacterianas crecen bajo condiciones mínimas, la célula no necesita la enzima galactosidasa beta. Bajo las condiciones mínimas una célula promedio contiene pocas copias de galactosidasa beta y una sola copia del mRNA correspondiente. Algunos minutos después de adicionar lactosa al medio de cultivo las células acumulan cerca de 1 000 veces el número de moléculas de galactosidasa beta. La presencia de la lactosa indujo la síntesis de esta enzima (fig. 12-27).

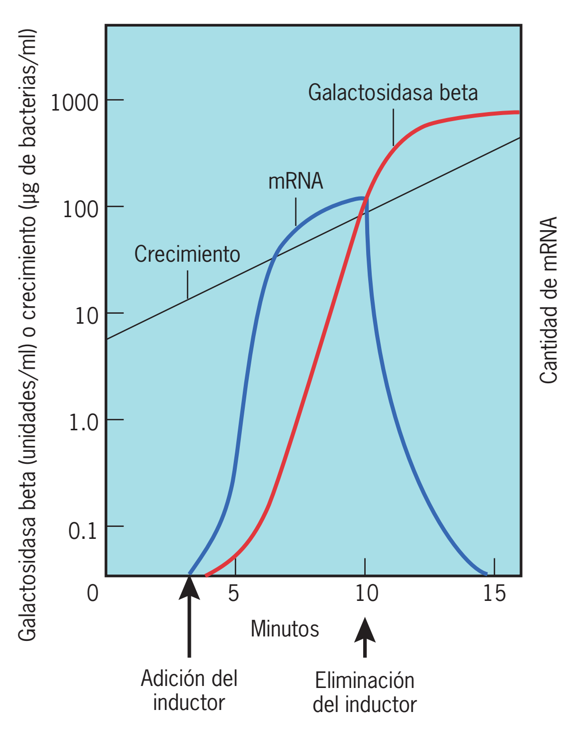


FIGURA 12-27 Cinética de la inducción de galactosidasa beta en *E. coli*. Cuando se agrega un inductor apropiado (un galactósido beta), la producción de mRNA por la enzima galactosidasa beta comienza de manera muy rápida, seguida 1 min o más después por la aparición de la enzima, cuya concentración se incrementa con rapidez. La remoción del inductor conduce a una caída del nivel del mRNA, lo que refleja su pronta degradación. Los niveles de enzima decaen luego porque ya no se sintetizan nuevas moléculas.

2. El triptófano es un aminoácido necesario para la síntesis de proteína. En ausencia de este compuesto en el medio una bacteria debe gastar energía para sintetizar este aminoácido. Las células que crecen en ausencia de triptófano contienen las enzimas, y su mRNA correspondiente, que se necesitan para la manufactura del triptófano. Sin embargo, si este aminoácido está disponible en el medio, las células no tienen que sintetizar su propio triptófano y en pocos minutos la producción de la enzima que participa en la vía de triptófano se suspende. En presencia de triptófano los genes que codifican estas enzimas se reprimen.

El operón bacteriano

En una bacteria, los genes que codifican las enzimas de una vía metabólica suelen agruparse juntos sobre un cromosoma en un complejo funcional que se conoce como **operón**. Todos los genes de un operón se controlan de manera coordinada mediante un mecanismo que Francois Jacob y Jacques Monod del *Instituto Pasteur* en París describieron por primera vez en 1961. Un operón bacteriano típico consta de genes estructurales, una región promotora, una región operadora y un gen regulador (fig. 12-28).

- Los **genes estructurales** codifican para las mismas enzimas. Los genes estructurales de un operón suelen yacer uno junto a otro y la polimerasa de RNA se mueve de un gen estructural al siguiente, transcribiendo todos estos genes en un solo mRNA. Este mRNA largo se traduce luego en diferentes enzimas individuales de la vía metabólica. En consecuencia el encendido de un gen enciende todos los genes que producen las enzimas de un operón.
- El **promotor** es el sitio donde la polimerasa de RNA se une al DNA antes del inicio de la transcripción (se discute en la pág. 433).
- El **operador**, que por lo general se localiza adyacente a o en traslape con el promotor (véase fig. 12-30), sirve como el sitio de unión para una proteína, que se conoce como **represor**. El represor es un ejemplo de **proteína reguladora de genes** (una proteína que reconoce una secuencia específica dentro del DNA y se une a ésta con alta afinidad). Como se evidenciará en las secciones de este capítulo, las proteínas que se unen al DNA, como los represores bacterianos, tienen una función predominante en la determinación de si un segmento particular del genoma se transcribe o no.
- El **gen regulador** codifica la proteína represora.

La clave para la expresión del operón se encuentra dentro del represor. Cuando el represor se une al operador (fig. 12-29), el

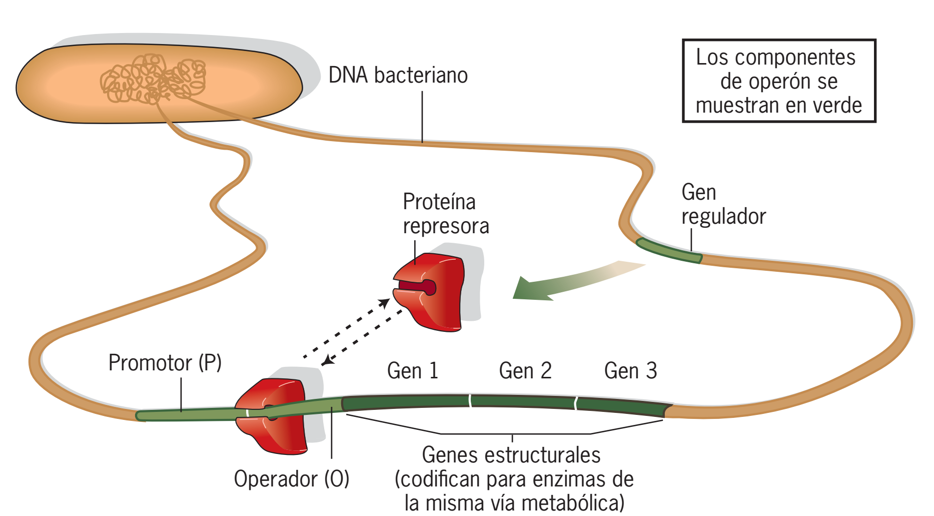


FIGURA 12-28 Organización de un operón bacteriano. Las enzimas que conforman una vía metabólica son codificadas por una serie de genes estructurales que residen en un ordenamiento continuo dentro del cromosoma bacteriano. Todos los genes estructurales de un operón se transcriben en un mRNA continuo, que se traduce en polipéptidos separados. La transcripción de genes estructurales la controla una proteína represora que, cuando se une al sitio operador del DNA, bloquea el movimiento de la polimerasa de RNA del promotor a los genes estructurales.

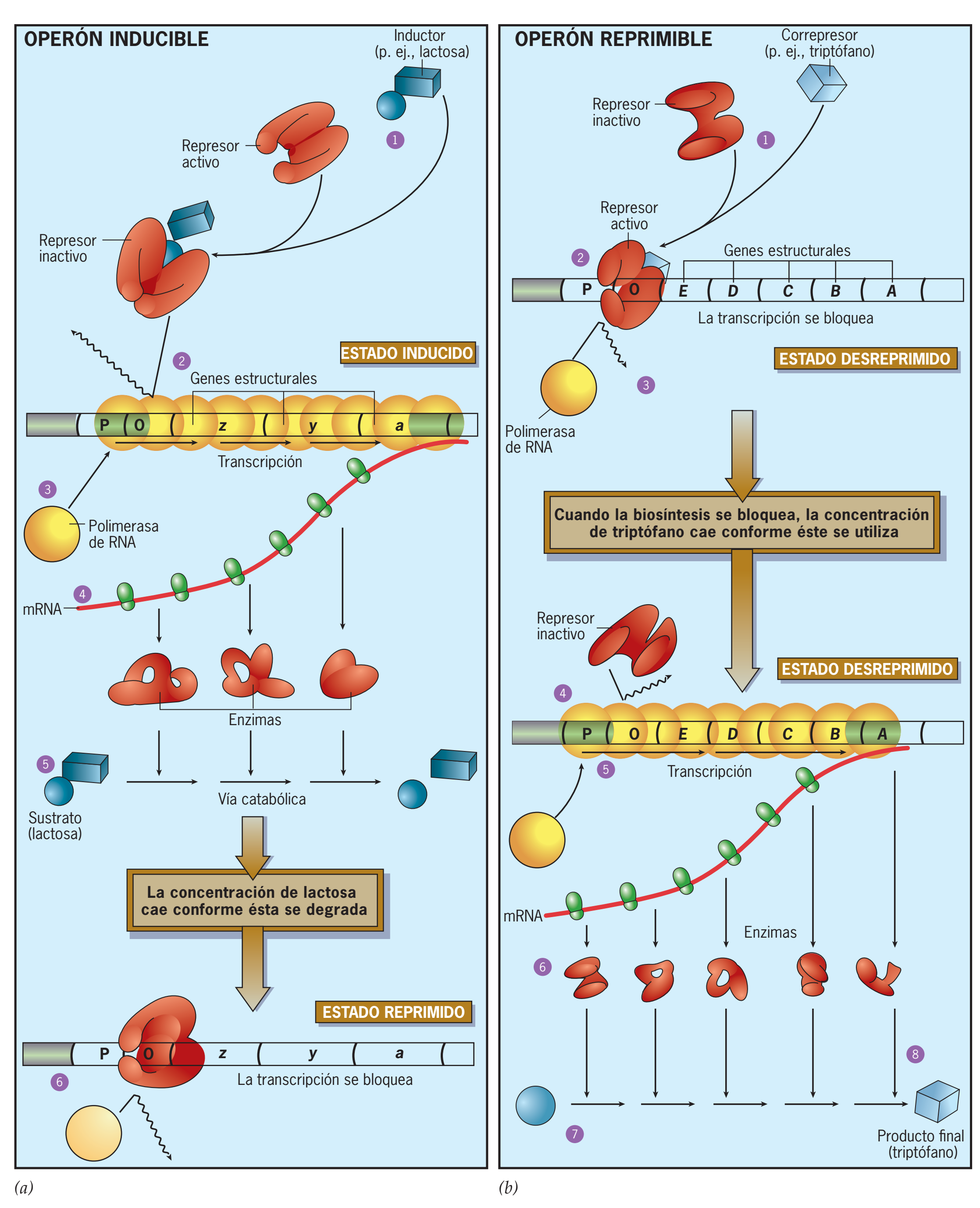


FIGURA 12-29 Regulación génica por medio de operones. Los operones inducibles y los reprimibles trabajan con un principio semejante: si el represor es capaz de unirse al operador, los genes se apagan; si el represor se inactiva o es incapaz de unirse al operador, los genes se expresan. *a*) En un operón inducible: 1) el inductor (en este caso el disacárido lactosa) se une a la proteína represora y 2) impide su unión con el operador (O). 3) Sin el represor en este proceso, la polimerasa de RNA se une al promotor (P) y 4) transcribe los genes estructurales. Por tanto, cuando la concentración de lactosa es alta, el operador se induce y las enzimas necesarias que digieren el azúcar se producen. 5) Conforme el azúcar se metaboliza, su concentración disminuye, 6) lo que ocasiona que las moléculas inductoras unidas se disocien del represor, que entonces readquiere su habilidad para unirse al operador e impedir la transcripción. De esta forma, cuando la concentración del inductor es baja, el operón se reprime e impide la síntesis de enzimas innecesarias. *b*) En un operón reprimible, como el operón *trp*, el represor por sí mismo es *incapaz* de unirse al operador y los genes estructurales que codifican para las enzimas se transcriben de manera activa. Las enzimas del operón *trp* catalizan las reacciones en las que esta enzima esencial se sintetiza: 1) Cuando está disponible, la molécula de triptófano actúa como correpresor al unirse al represor inactivo y 2) al cambiar su estructura, lo que permite que se una al operador y 3) evita la transcripción de genes estructurales. Por tanto, cuando la concentración de triptófano es alta, el operador se reprime y ello previene la sobreproducción de triptófano. 4) Cuando la concentración de triptófano es baja, la mayoría de las moléculas del represor pierde un correpresor y en consecuencia no se unen al operador. 5) Los genes se transcriben, 6) las enzimas se sintetizan y 7) el producto terminal (triptófano) necesario se produce (8).

promotor se protege contra la polimerasa y la transcripción de los genes estructurales se inhibe. La capacidad del represor para unirse con el operador e inhibir la transcripción depende de la conformación de la proteína, que es regulada alostéricamente por un compuesto clave en la vía metabólica, como la lactosa o el triptófano, como se describe en forma breve. La concentración de este componente clave metabólico es la que determina si el operador es activo o inactivo en un momento dado.

El operón *lac* La interrelación entre estos diversos elementos se ilustra mediante el *operón lac* (el grupo de genes que regula la producción de enzimas necesarias para degradar lactosa en las células bacterianas). El operón *lac* es un ejemplo de un **operón inducible**, esto es, uno en el que la presencia de una sustancia metabólica clave (en este caso lactosa) induce la transcripción de genes estructurales (fig. 12-29*a*). El operón *lac* contiene tres genes estructurales en tándem: el gen *z*, que codifica la galactosidasa beta; el gen *y*, que codifica la permeasa de galactósido, una proteína que promueve la entrada de la lactosa a la célula, y un gen *a*, que codifica la acetiltransferasa de tiogalactósido, una enzima cuya función fisiológica es poco clara. Si la lactosa está presente en el medio, el disacárido entra a la célula donde se une con el represor *lac*, cambia la conformación del represor y lo convierte en incapaz de unirse a la región operadora del DNA. En tal estado los genes estructurales se transcriben, la enzima se sintetiza y las moléculas de lactosa se catabolizan. Por tanto en un operón inducible, como *lac*, la proteína represora sólo puede unirse al DNA en ausencia de lactosa, que funciona como un **inductor**.[6] Conforme la concentración de lactosa en el medio disminuye, el disacárido se disocia de su sitio de unión en la molécula represora. La liberación de lactosa capacita al represor para unirse a la región operadora, lo que bloquea la polimerasa para alcanzar los genes estructurales y apaga la transcripción del operón.

Control positivo por AMP cíclico (monofosfato de adenosina cíclico) Los represores, como los de los operones *lac* y *trp*, ejercen su influencia por *control negativo*, como la interacción de estas proteínas con el DNA que inhibe la expresión de genes. El operón *lac* también se encuentra bajo *control positivo* según se descubrió durante una investigación temprana del fenómeno llamado *efecto de glucosa.* Si las células bacterianas se alimentan tanto con glucosa como con otras sustancias, por ejemplo, lactosa o galactosa, catabolizan la glucosa e ignoran los otros componentes. La glucosa en el medio actúa para suprimir la producción de varias enzimas catabólicas, como la galactosidasa beta, necesarias para degradar las otras sustancias. En 1965 se realizó un hallazgo sorprendente: el AMP cíclico (cAMP), que antes se pensaba que sólo participaba en el metabolismo eucariota, se detectó en células de *E. coli*. Se encontró que la concentración de cAMP en las células se relacionaba con la presencia de glucosa en el medio; a mayor concentración de glucosa, menor concentración de cAMP. Aún más, cuando se agregó cAMP al medio en presencia de glucosa, las células sintetizaron de manera repentina las enzimas catabólicas que en condiciones normales estaban ausentes.

Aunque el mecanismo exacto por el que la glucosa disminuye la concentración de cAMP se desconoce, el mecanismo por el que el cAMP supera el efecto de la glucosa se entiende bien. Como era de esperar, una molécula pequeña como cAMP (véase fig. 15-11) no puede estimular la expresión de una batería de genes específica. Como en las células eucariotas, el cAMP actúa en las células procariotas al unirse a una proteína, en este caso a la *proteína receptora de cAMP* (*CRP*). Aunque la CRP por sí misma es incapaz de unirse al DNA, el complejo cAMP-CRP reconoce y une un sitio específico de la región de control de *lac* (fig. 12-30). La presencia de la unión de CRP ocasiona un cambio en la conformación del DNA, que permite que la polimerasa de RNA transcriba el operón *lac*. Por tanto, la presencia

[6] El inductor real es la alolactosa, que se deriva y difiere de la lactosa por el tipo de unión de enlace entre los dos azúcares. Esta característica no se toma en cuenta en la discusión.

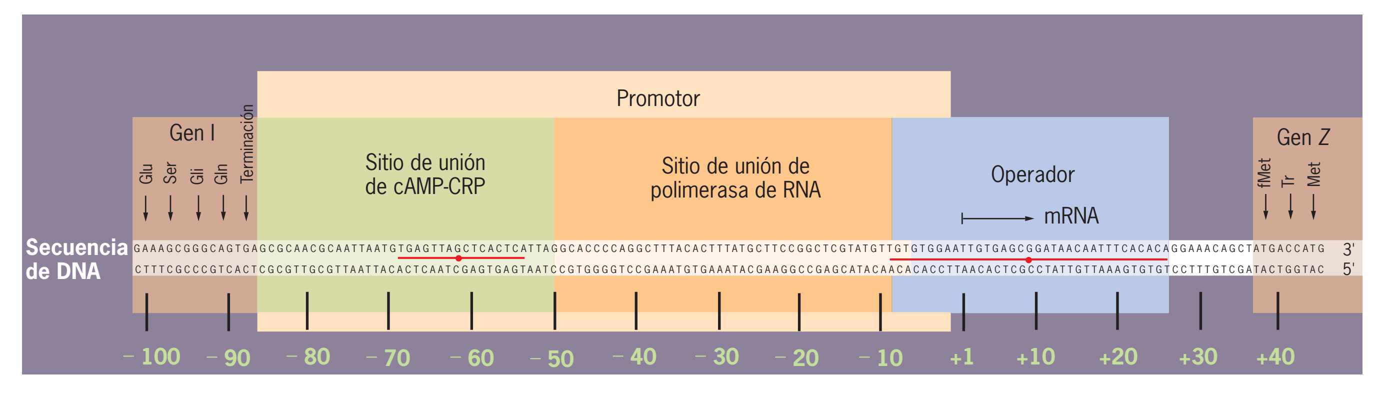


FIGURA 12-30 Secuencia nucleotídica de sitios de unión en la región de control del operón *lac*. La región promotora contiene el sitio de unión tanto para la proteína CRP como para la polimerasa de RNA. El sitio de inicio de la transcripción se define como +1, que se encuentra alrededor de 40 nucleótidos corriente arriba del sitio en que la traducción se inicia. Las regiones de simetría de secuencia en el sitio CRP y el operador se indican mediante la línea roja horizontal. (Reimpresa con autorización de R. C. Dickson et al., Science 187:32, 1975; © derechos reservados 1975, American Association for the Advancement of Science.)

del complejo cAMP-CRP es necesaria para la transcripción del operón, aun cuando la lactosa está presente y el represor es inactivo. Conforme la glucosa es más abundante, las concentraciones del cAMP permanecen por debajo de las requeridas para promover la transcripción del operón.

El operón *trp* En un operón *reprimible*, como el operón triptófano (o *trp*), el represor es incapaz de unirse al DNA operador por sí mismo. De hecho el represor se activa como una proteína que se une al DNA sólo cuando forma un complejo con un factor específico, como el triptófano (fig. 12-29*b*), que funciona como un *correpresor*. En ausencia de triptófano, el sitio operador está abierto para la unión de la polimerasa de RNA, que transcribe los genes estructurales del operón *trp* y conduce a la producción de las enzimas que sintetizan triptófano. Cuando el triptófano está disponible, las enzimas de la vía de la síntesis del triptófano ya no se requieren. Bajo estas condiciones el incremento de la concentración de triptófano lleva a la formación del complejo triptófano-represor, que bloquea la transcripción.

Ribointerruptores

En los últimos años un tipo de mecanismo diferente ha captado la atención de los investigadores que estudian la regulación génica bacteriana. Se ha descubierto que no son sólo proteínas (como los represores *lac* y *trp*) las moléculas reguladoras génicas que son influidas por la interacción con metabolitos pequeños. Se han identificado varios RNA mensajeros bacterianos capaces de unirse con notable especificidad a un metabolito pequeño, como glucosamina o adenina. El metabolito se fija a una región no codificadora 5′ o 3′ del mRNA. Una vez unidos al metabolito, estos mRNA, o **ribointerruptores**, experimentan un cambio en su conformación plegada que les permite modificar la expresión de un gen implicado en la producción de ese metabolito. La mayoría de los ribointerruptores suprimen la expresión génica bloqueando el fin de la transcripción o el inicio de la traducción. Como los represores que actúan de manera conjunta con operones, los ribointerruptores permiten que las células ajusten su nivel de expresión génica en respuesta a cambios en la disponibilidad de determinados metabolitos. Dado que actúan sin la participación de cofactores proteínicos, es probable que los ribointerruptores sean un legado de un mundo de RNA ancestral (pág. 458). Se ha descubierto un tipo de ribointerruptor en plantas y hongos, y está en marcha la búsqueda de este nuevo tipo de regulación génica en células animales.

REVISIÓN ?

1. Describa la cascada de fenómenos que produce cambios repentinos en la expresión génica en una célula bacteriana tras la adición de lactosa al medio de cultivo. ¿Cómo se compara con los fenómenos que ocurren en respuesta a la adición de triptófano?
2. ¿Cuál es la función del AMP cíclico en la síntesis de galactosidasa beta?
3. ¿Qué es un ribointerruptor?

12.3 CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EUCARIOTAS

Además de poseer un genoma que contiene decenas de miles de genes, las plantas y los animales se componen de muchos tipos de células diferentes. Los vertebrados, por ejemplo, están formados por cientos de células de tipos distintos, cada uno mucho más complejo que una célula bacteriana y que requiere una batería distinta de proteínas capaces de realizar actividades especializadas.

En algún tiempo los biólogos pensaron que las células adquirían su estado de diferenciación particular al retener parte de los cromosomas necesarios para las funciones de ese tipo de célula, en tanto se eliminaban otras partes de estos cromosomas que no se requerirían. La idea de que la diferenciación se acompañaba de la pérdida de información genética se eliminó por completo entre los decenios de 1950 y 1960 mediante una serie de experimentos clave tanto en plantas como en animales que demostraron que las células diferenciadas retenían los genes necesarios para convertirse en otra célula en ese organismo. Como un ejemplo, Frederick Steward y sus colaboradores de la *Cornell University* demostraron que una célula obtenida de la raíz de una planta madura podía inducirse para crecer en una planta completa y desarrollada que contenía todos los tipos celulares que en condiciones normales estaban presentes.

Aunque una célula única de un animal adulto no puede originar individuos nuevos, está comprobado que el núcleo de estas células contiene toda la información necesaria para desarrollar un organismo nuevo. Lo anterior se demostró en forma espectacular en 1997, cuando Ian Wilmut y sus colegas de un instituto escocés de investigación dieron a conocer el primer mamífero clonado (la oveja Dolly).[7] Para lograr esta hazaña tan controvertida los investigadores prepararon dos tipos de células: 1) un oocito de oveja no fertilizado cuyos cromosomas se habían eliminado, y 2) células cultivadas derivadas de la glándula mamaria (ubre) de una oveja adulta. Cada uno de los oocitos enucleados se fusionó con una de las células cultivadas (fig. 12-31). La fusión celular se completó al unir los dos tipos celulares y someterlos a un breve pulso eléctrico, que también sirvió para estimular el inicio del desarrollo embrionario del huevo. Este procedimiento permitió, en esencia, trasplantar un núcleo de una célula adulta en un oocito carente de material genético. Mediante el uso de las instrucciones genéticas aportadas por este nuevo núcleo, un huevo se desarrolla en un cordero que contiene todas las células diferenciadas que se encuentran en este animal. Desde

[7] La oveja Dolly murió en 2003 a los seis años de edad, que es la mitad de la vida normal de una oveja doméstica. El animal murió de una enfermedad pulmonar progresiva, pero también sufrió artritis, una alteración rara en las ovejas jóvenes. La muerte de Dolly confirmó las observaciones realizadas en otras especies de que los animales clonados tienden a sufrir enfermedades, inclusive posible muerte por envejecimiento prematuro, con una incidencia mucho más alta que los animales control. Tal vez el lector se pregunte si estos problemas de salud se debieron a que el animal clonado comenzó su vida con telómeros cortos. Si bien es cierto que los cromosomas del núcleo donante tienen telómeros más cortos porque dicho núcleo se obtiene de un tejido adulto, los telómeros de los cromosomas donantes se alargan después de la transferencia al interior del óvulo, por efecto de la telomerasa presente en el citoplasma ovular. En consecuencia, se cree que los animales clonados tienen telómeros de longitud normal.

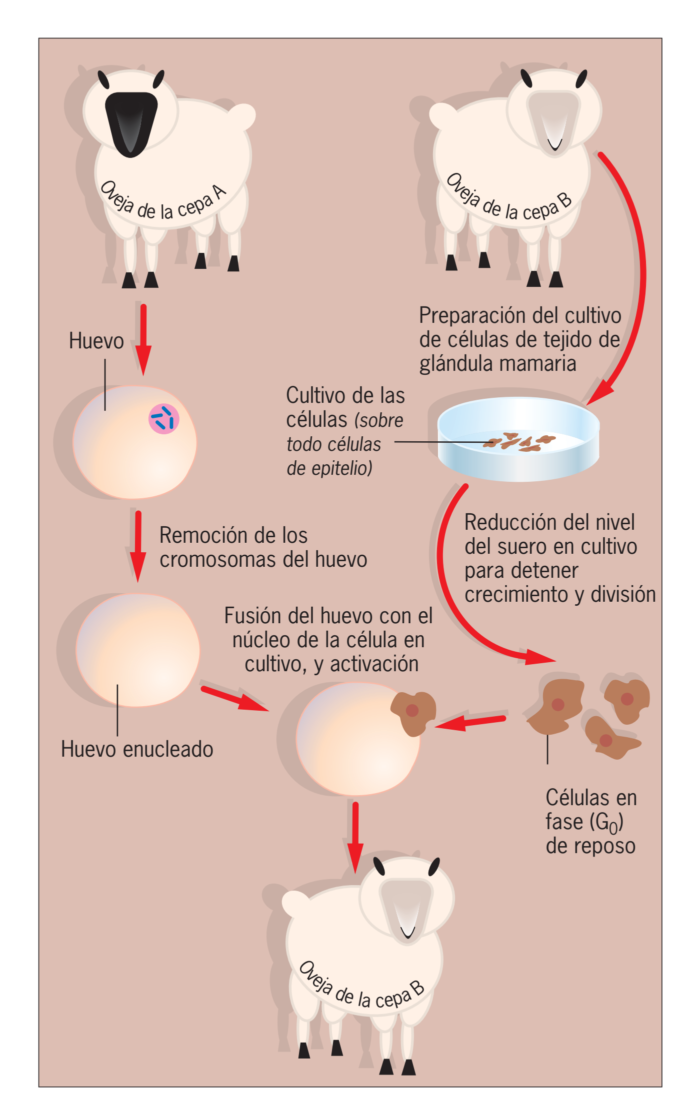


FIGURA 12-31 La clonación de animales demuestra que el núcleo retiene un complemento íntegro de información genética. En este experimento un huevo enucleado de oveja de una cepa se fusionó con una célula de glándula mamaria de una hembra de otra cepa. El oocito activado se desarrolló en una oveja sana. Como todos los genes de la oveja recién nacida se derivaron de núcleo trasplantado (lo que se demostró mediante marcadores genéticos), este experimento confirma el concepto generalizado de que las células diferenciadas retienen toda la información genética originalmente presente en el cigoto. [La dificultad primaria en los experimentos de trasplante nuclear suele presentarse cuando el núcleo de una célula somática (no germinativa) se coloca de manera repentina en el citoplasma de un huevo hasta cierto punto inactivo. Para evitar dañar el núcleo donante, las células cultivadas se llevaron a un estado de reposo (llamado G_0) mediante la reducción drástica del contenido de suero en el medio de cultivo.]

el nacimiento de la oveja Dolly los investigadores han clonado de modo satisfactorio otros animales, entre ellos, ratones, vacas, cabras, cerdos, conejos y gatos (véase fig. 12-14*c*).

Estos experimentos evidenciaron que el núcleo de las células especializadas, como las que provienen de las raíces de una planta o de una glándula de un animal, contienen la información genética necesaria para la diferenciación en otros tipos celulares. De hecho cada célula del cuerpo humano alberga un grupo completo de "genes humanos". Por tanto, no es la presencia o ausencia de genes en una célula la que determina las propiedades de la misma, sino la forma en que esos genes se utilizan. Por ejemplo, las células que se convierten en células hepáticas lo hacen porque expresan un grupo específico de "genes del hígado", en tanto que al mismo tiempo reprimen los genes cuyos productos no participan en la función hepática. Además, cada uno de los genes implicados en el desarrollo hepático debe expresarse en el momento apropiado de la diferenciación y en un grado adecuado. El tema de la expresión selectiva de los genes, que constituye el corazón de la biología molecular, ocupará el resto de este capítulo.

Una célula bacteriana promedio contiene suficiente DNA para codificar alrededor de 3 000 polipéptidos, de los que cerca de un tercio se expresa en cualquier momento. Compárese lo anterior con una célula humana, la cual contiene suficiente DNA (6 mil millones de pares de bases) para codificar varios millones de polipéptidos diferentes. Aunque la mayor parte de este DNA no contiene información codificadora de proteínas, se estima que una célula de mamífero típica produce por lo menos 5 000 polipéptidos distintos en cualquier momento. Muchos de estos polipéptidos, como las enzimas de la glucólisis y los transportadores de electrones de la cadena respiratoria, se sintetizan en casi todas las células del organismo. Asimismo cada tipo celular sintetiza proteínas que son únicas para su estado diferenciado. Estas proteínas, más que cualquier otro componente, confieren a la célula sus características únicas. A causa de la enorme cantidad de ácido desoxirribonucleico que se encuentra en las células eucariotas y el gran número de proteínas distintas que se ensamblan, la regulación de la expresión de genes eucariotas es un proceso complejo y extraordinario que apenas comienza a entenderse.

Considérese la situación que enfrenta una célula que se desarrolla en un glóbulo rojo en la médula ósea de un hueso humano. La hemoglobina constituye más de 95% de la proteína de estas células, aunque los genes que codifican para los polipéptidos de hemoglobina representan menos de una millonésima parte de su DNA total. Las células no sólo tienen que encontrar esta aguja genética en el pajar cromosómico, también deben regular su expresión con tal grado de precisión que la producción de estos pocos polipéptidos se convierta en la actividad sintética dominante de las células. Puesto que la cadena de fenómenos que conducen a la síntesis de una proteína consta de diferentes etapas, el control puede ejercerse a distintos niveles.

La regulación de la expresión génica en células eucariotas ocurre sobre todo a tres niveles distintos, como se ilustra en la figura 12-32:

1. **A nivel transcripcional, mecanismos de control** determinan si un gen particular puede transcribirse y, si es así, con qué frecuencia.
2. **A nivel del procesamiento, mecanismos de control** determinan la vía por la que la transcripción primaria de mRNA (pre-mRNA) se procesa en un RNA mensajero que puede transcribirse en un polipéptido.
3. **A nivel traduccional, mecanismos de control** determinan cuándo un mRNA particular se traduce y, si esto ocurre, con qué frecuencia y durante cuánto tiempo.

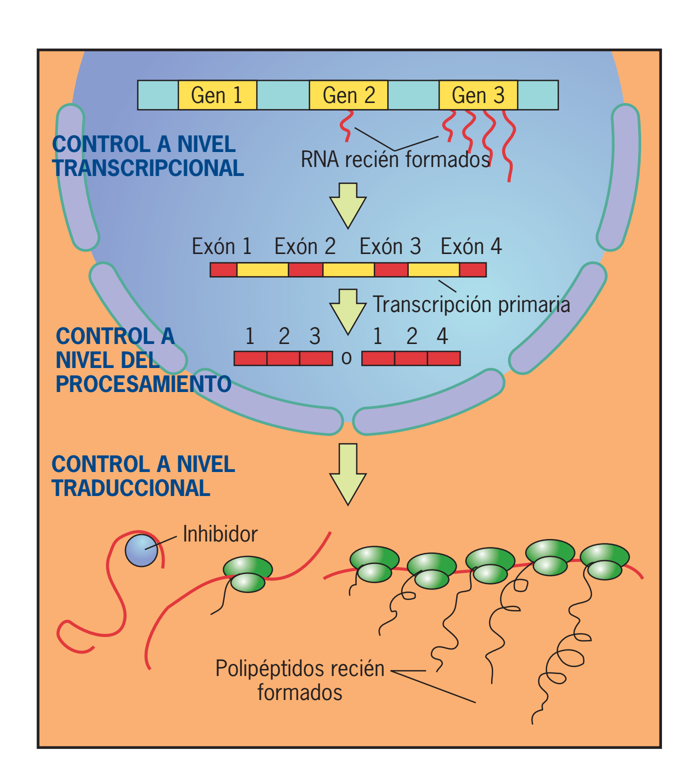


FIGURA 12-32 Resumen de los diferentes niveles de control de la expresión génica. Los controles a nivel transcripcional operan mediante la determinación de qué genes se transcriben y con qué frecuencia; los controles a nivel transcripcional operan para determinar qué parte de la transcripción primaria se convierte en parte del grupo de mRNA celulares, y el control a nivel traduccional regula si un mRNA particular se transcribe o no y, si es así, qué tan a menudo y por cuánto tiempo.

FIGURA 12-33 Demostración experimental de la expresión específica de tejido de un gen que participa en la diferenciación celular del músculo. La transcripción del gen de miogenina se activa de modo específico en aquellas partes de este embrión de ratón de 11.5 días de edad (el miotomo de los somitas) que darán lugar al tejido muscular. La fotografía muestra un embrión de ratón transgénico que contiene la región reguladora del gen de miogenina localizada corriente arriba de un gen de galactosidasa beta bacteriana, que actúa como un gen *reportero.* Por lo general el gen de galactosidasa beta se emplea para vigilar la expresión de tejidos específicos de un gen, porque la presencia de la enzima galactosidasa beta se revela con facilidad mediante la producción de la coloración azul en una prueba histoquímica sencilla. La activación de la transcripción, que resulta de factores transcripcionales que se unen a la región reguladora del gen de la miogenina, se indica con las células teñidas de azul. (Tomada de T. C. Cheng et al., cortesía de Eric N. Olson, J Cell Biol. 119:1652, 1992. Mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

En las siguientes secciones de este capítulo se considera cada una de estas estrategias de regulación.

12.4 CONTROL A NIVEL TRANSCRIPCIONAL

Como en las células procariotas, la transcripción diferencial de genes es el mecanismo aislado más importante por el que las células eucariotas determinan qué proteínas se sintetizarán en cualquier momento de su vida. Numerosas evidencias indican que genes diferentes se expresan mediante células en etapas distintas del desarrollo embrionario, células en tejidos diversos o células expuestas a diversos tipos de estímulos. La figura 12-33 muestra un ejemplo de la expresión específica de tejido de un gen. En este caso un gen que codifica una proteína específica de músculo se transcribe en las células de un embrión de ratón que dará lugar al tejido muscular del animal. Una técnica diferente para estudiar el control a nivel transcripcional que se aplica desde hace poco tiempo es el uso de los **microordenamientos de DNA** (o "chips de DNA"). Con esta tecnología los investigadores pueden vigilar la expresión de miles de genes de una población celular particular en un solo experimento.

Se han desarrollado varios tipos de micromatrices. La figura 12-34 ilustra el empleo del microordenamiento de DNA para comparar las poblaciones de mRNA presentes en las células de levadura bajo dos condiciones distintas de crecimiento. La parte *a* de la figura presenta un resumen de los pasos básicos de estos experimentos; tales pasos pueden describirse brevemente como sigue:

1. Los fragmentos de DNA que representan los genes individuales a estudiar se generan mediante las técnicas de clonación de DNA que se describen en el capítulo 18 (PCR, fig. 18-43; clonación de DNA, fig. 18-39). En el caso que se muestra en el paso de la parte inferior de la figura 12-34*a,* cada base de la placa coloca un volumen pequeño que contiene un gen específico clonado de levadura. Cada base contiene genes diferentes. Los DNA clonados se depositan luego en forma de gota, uno a la vez, en un arreglo ordenado sobre un portaobjetos de vidrio mediante un instrumento automatizado que libera pocos nanolitros de la solución concentrada de DNA en un punto específico del portaobjetos (paso b). El paso c muestra un microordenamiento de DNA completo. Con esta técnica los fragmentos de DNA de miles de genes diferentes pueden gotearse en localizaciones conocidas sobre la superficie de vidrio.

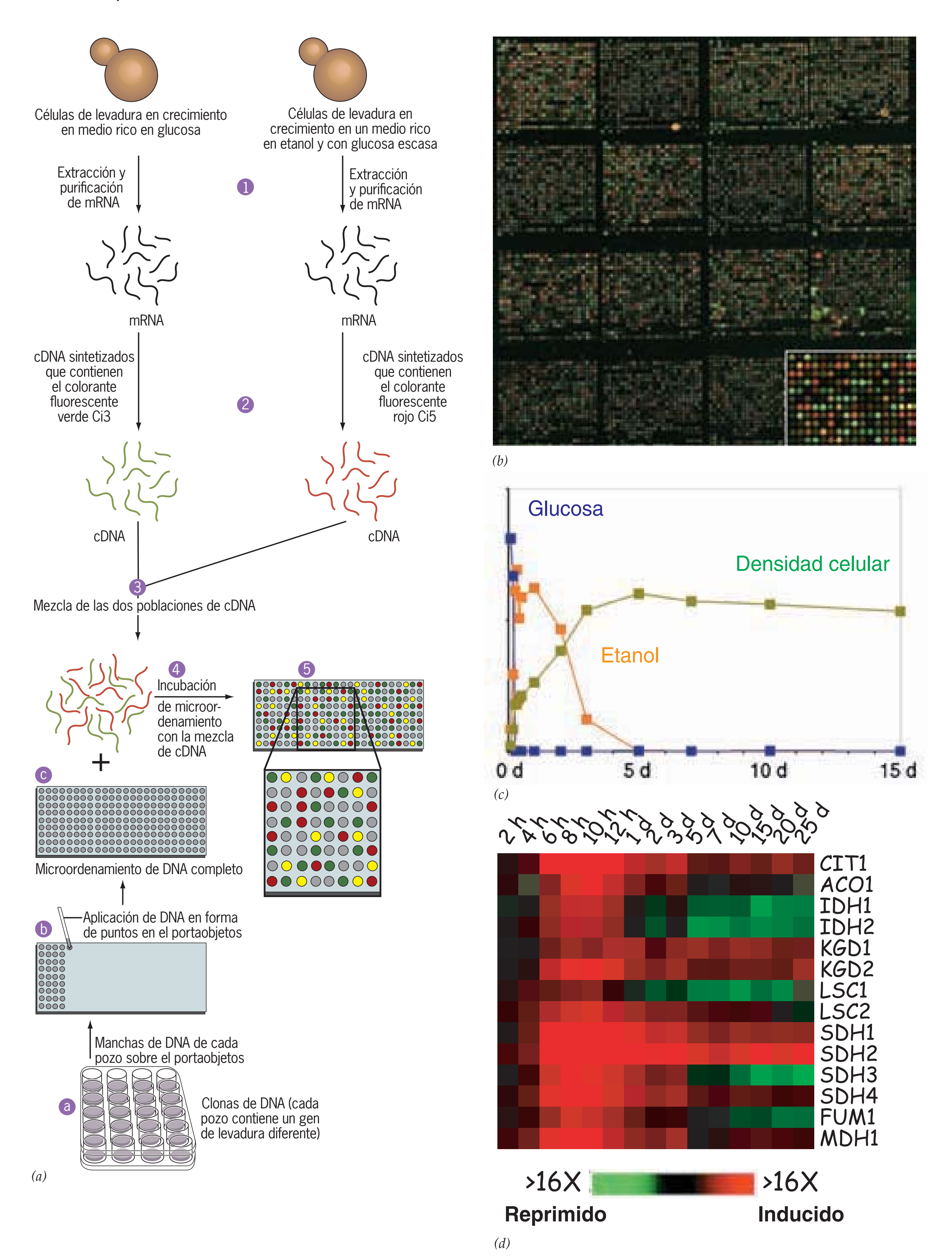

Células de levadura en crecimiento en medio rico en glucosa
Células de levadura en crecimiento en un medio rico en etanol y con glucosa escasa
Extracción y purificación de mRNA
1
Extracción y purificación de mRNA
mRNA
mRNA
cDNA sintetizados que contienen el colorante fluorescente verde Ci3
2
cDNA sintetizados que contienen el colorante fluorescente rojo Ci5
cDNA
cDNA
3
Mezcla de las dos poblaciones de cDNA
4
Incubación de microordenamiento con la mezcla de cDNA
5
c
Microordenamiento de DNA completo
b
Aplicación de DNA en forma de puntos en el portaobjetos
Manchas de DNA de cada pozo sobre el portaobjetos
a
Clonas de DNA (cada pozo contiene un gen de levadura diferente)
(a)
(b)
Glucosa
Densidad celular
Etanol
0 d
5 d
10 d
15 d
(c)
2 h
4 h
6 h
8 h
10 h
12 h
1 d
2 d
3 d
5 d
7 d
10 d
15 d
20 d
25 d
CIT1
ACO1
IDH1
IDH2
KGD1
KGD2
LSC1
LSC2
SDH1
SDH2
SDH3
SDH4
FUM1
MDH1
>16X
>16X
Reprimido
Inducido
(d)

FIGURA 12-34 La producción de microordenamientos de DNA y su utilización en la vigilancia de la transcripción génica. *a*) Pasos en la construcción de un microordenamiento de DNA. Preparación de los cDNA (p. ej., los DNA que representan los mRNA que se encuentran en una célula) usados en el experimento que se muestra en los pasos 1 a 3. La preparación de los microordenamientos de DNA se ilustra en los pasos de a hasta c. La mezcla de cDNA se incuba con el microarreglo en el paso 4 y en el paso 5 se muestra un resultado hipotético. La intensidad del color de cada mancha es proporcional al número de cDNA unidos. *b*) Resultados de un experimento realizado con una mezcla de cDNA que representan las transcripciones de mRNA de células de levadura en presencia de glucosa (cDNA marcados con verde) y tras la depleción de glucosa (cDNA marcados con rojo). Las manchas que exhiben fluorescencia amarilla corresponden a genes que se expresan bajo ambas condiciones de cultivo. El recuadro inferior derecho muestra un acercamiento de una pequeña porción del microordenamiento. Los detalles de este experimento se discuten en el texto. *c*) Esquema que muestra los cambios de las concentraciones de glucosa y etanol en el medio y de la densidad celular durante el experimento. Al principio las células de levadura consumen glucosa, y entonces generan el etanol por fermentación y por último dejan de crecer después que ambas fuentes de energía química se agotan. *d*) Cambios en la expresión de genes que codifican las enzimas del ciclo del ATC durante el curso del experimento. Cada línea horizontal describe el nivel de expresión de un gen particular en diferentes periodos. Los nombres de los genes se presentan a la derecha (véase la figura 5-7 para las enzimas). Los cuadros rojos indican el más alto nivel de expresión génica y los cuadros verdes, el nivel más bajo de expresión. Se observa que la expresión de genes que codifican las enzimas del ciclo del ATC se induce conforme las células comienzan a metabolizar etanol y se reprime cuando el etanol se agota. (*B* a *D*, cortesía de Patrick O. Brown. Véase Joseph DeRisi et al., Science 278:680, 1997, y Tracy L. Ferea y Patrick O. Brown, Curr Opin Gen Develop 9:715, 1999.)

2. Entre tanto los mRNA presentes en las células en estudio se purifican (paso 1, fig. 12-34) y convierten en una población de DNA complementarios marcados con fluorescencia (cDNA) (paso 2). El método para preparar los cDNA también se describe en el capítulo 18 (véase fig. 18-45). En el ejemplo que se ilustra en la figura 12-34, y se explica después, una de las preparaciones de cDNA de dos poblaciones celulares distintas se marcó con un colorante verde fluorescente y la otra con un colorante rojo fluorescente. Las dos preparaciones de cDNA marcadas se mezclaron (paso 3) e incubaron con el portaobjetos que contiene el DNA inmovilizado (paso 4).
3. Los DNA del microordenamiento que se hibridaron al cDNA marcado se identifican al examinar el portaobjetos bajo el microscopio (paso 5). Cualquier mancha en el microordenamiento que exhibe fluorescencia representa un gen transcrito en las células que se estudian.

La figura 12-34*b* muestra los resultados de este experimento. Cada punto del microarreglo de la figura 12-34*b* contiene un fragmento de DNA inmovilizado de un gen distinto en el genoma de la levadura. Si se toman juntos, los puntos contienen el DNA de todos los 6 200 genes que codifican proteínas presentes en una célula de levadura. Como se discutió antes, este microordenamiento de DNA particular se hibridizó con una mezcla de dos poblaciones de cDNA diferentes. Una población de cDNA, que se marcó con colorante fluorescente verde, se preparó a partir del mRNA de las células de levadura que crecieron en presencia de altas concentraciones de glucosa. A diferencia de lo que ocurre en el caso de la mayoría de las células, cuando las células de levadura de panificación se cultivan en presencia de glucosa y oxígeno, obtienen su energía por medio de glucólisis y fermentación, y convierten con rapidez la glucosa en etanol (sección 3.3). La otra población de cDNA, que se marcó con colorante fluorescente rojo, se preparó a partir del mRNA de células de levadura que crecieron de manera aeróbica en un medio rico en etanol pero sin glucosa. Las células que crecen bajo estas condiciones obtienen su energía mediante fosforilación oxidativa, que requiere las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico (ATC) (pág. 185). Las dos poblaciones de cDNA se mezclaron e hibridaron al DNA del microordenamiento, y el portaobjetos se examinó en un microscopio de fluorescencia. Los genes que muestran actividad en uno o en otro medio de crecimiento aparecen como manchas verdes o rojas en el microordenamiento (paso 5, fig. 12-34*a*, *b*). Las manchas sin color de la figura 12-34 representan los genes que no se transcriben en estas células en ninguno de los medios de cultivo, en tanto que las manchas que tienen una fluorescencia amarilla representan genes que se transcriben en las células cultivadas en los dos tipos de medio. El recuadro muestra una vista cercana de una pequeña porción del microordenamiento.

Los resultados experimentales que la figura 12-34*b* ilustra identifican los genes que se transcriben en células de levaduras bajo las dos condiciones de crecimiento. Pero de la misma importancia, también proveen información respecto a la abundancia de los mRNA individuales en las células, que es proporcional a la intensidad de fluorescencia de cada mancha. Una mancha que muestra una fluorescencia verde muy fuerte, por ejemplo, representa un gen cuyas transcripciones son abundantes en las células de levaduras que crecen en glucosa pero se reprimen en las células de levadura que crecen en etanol. Las concentraciones de mRNA individuales pueden variar por más de 100 veces en células de levadura. La técnica es tan sensible que un mRNA puede detectarse a un nivel de menos de una copia por célula.[8]

La figura 12-34*c* muestra los cambios en la concentración de glucosa y etanol en el curso del experimento. Las células de levadura metabolizan con rapidez la glucosa, lo que ocasiona la desaparición del azúcar en pocas horas. Las células de levadura metabolizan de manera gradual el etanol que se produce por la fermentación de glucosa en los días posteriores hasta que desaparece del medio. La figura 12-34*d* ilustra los cambios en el nivel de expresión de los genes que codifican las enzimas del ciclo del ATC durante el curso de este experimento. Los niveles de expresión de cada gen (marcados a la derecha) se muestran en intervalos (marcados en la parte superior) con sombreados de rojo para representar el incremento en la expresión y sombreados de verde para representar la disminución en la expresión. Es evidente que la transcripción de genes que codifican las enzimas de ATC se estimula cuando las células se adaptan al crecimiento en una fuente de carbón (etanol) que se metaboliza por la respiración aeróbica y después se reprime cuando el etanol se agota.

[8] Es probable que las diferencias en la abundancia de mRNA reflejen divergencias en la estabilidad del mRNA (pág. 535), así como diferencias en la tasa de transcripción. En consecuencia, los resultados obtenidos de los microordenamientos de DNA no pueden interpretarse *sólo* sobre la base del control transcripcional.

En la actualidad los microordenamientos de DNA se utilizan para estudiar los cambios en la expresión génica que ocurren durante una amplia variedad de sucesos biológicos, como la división celular y la transformación de una célula normal en una célula maligna. También permiten estudiar la diversidad de RNA que una sola célula tumoral produce, una vez que los cDNA se amplifican por PCR. Ahora que las secuencias de una variedad de genomas eucariotas se conocen, los investigadores cuentan una variedad de genes ilimitada cuya expresión puede analizarse en distintas condiciones.

Los microordenamientos de DNA tienen muchos usos potenciales además de proporcionar una visión de la expresión génica. Por ejemplo, tales microordenamientos pueden emplearse para determinar el grado de variación genética en la población humana o identificar los alelos para genes particulares que una persona porta en sus cromosomas. Se tiene la esperanza de que algún día esta información pueda prevenir a una persona respecto a las enfermedades a las que pueda ser susceptible durante su vida y darle una oportunidad para tomar medidas preventivas tempranas.

La función de los factores de transcripción en la regulación de la expresión génica

Ha habido grandes progresos en lo que se refiere a la manera como ciertos genes se transcriben en una célula particular, en tanto que otros genes permanecen inactivos. El control transcripcional es orquestado por un gran número de proteínas llamadas **factores transcripcionales**. Como se estudió en el capítulo 11, estas proteínas pueden dividirse en dos clases funcionales: factores transcripcionales generales que se unen a los sitios promotores nucleares en relación con la polimerasa de RNA (pág. 445) y factores transcripcionales específicos de secuencia que se unen a varios sitios reguladores de genes particulares. Este último grupo de factores transcripcionales puede actuar como *activadores transcripcionales* que estimulan la transcripción de genes adyacentes o como *represores transcripcionales* que inhiben la transcripción.

En esta sección el interés se centra en los activadores transcripcionales, cuyo trabajo es transmitir la información codificada en el DNA a la maquinaria transcripcional de la célula. Aunque la estructura de diferentes factores transcripcionales y la forma en que interactúan con sus secuencias de DNA blanco se conocen a detalle, hasta el momento no se cuenta con una visión unificada de sus mecanismos de operación. Por ejemplo, se presume que un solo gen puede controlarse mediante muchos sitios de regulación diferentes de DNA que unen una variedad de factores transcripcionales. En cambio, un solo factor transcripcional puede unirse a numerosos sitios alrededor del genoma y por tanto controlar la expresión de diferentes genes de un hospedador. Cada tipo de célula tiene un patrón característico de transcripción de genes, que está determinado por el complemento particular de factores de transcripción contenidos en la célula.

El control de la transcripción de genes es complejo y recibe la influencia de diversas circunstancias, inclusive la afinidad de los factores de transcripción por secuencias de DNA y la habilidad de los factores de transcripción unidos a los sitios cercanos en el DNA para interactuar de modo directo entre sí. La figura 12-35 ilustra un ejemplo de este tipo de interacción cooperativa entre factores transcripcionales vecinos y se discute en la página 521. En un sentido, las regiones reguladoras de un gen pueden semejarse a un centro de integración para la expresión génica. Las células expuestas a diferentes estímulos responden mediante la síntesis de factores transcripcionales diferentes, que se unen a sitios distintos en el DNA. La extensión a la que un gen particular se transcribe parece depender de la *combinación* específica de factores transcripcionales que se unen a elementos reguladores corriente arriba. Puesto que 5 a 10% del genoma codifica factores transcripcionales, se sabe que puede ocurrir un número ilimitado de combinaciones entre estas proteínas. La complejidad de estas interacciones entre DNA y proteínas reguladoras es revelada por la notable variación en los patrones de expresión génica entre células de diversos tipos, varios tejidos, diferente estado de desarrollo y distinto estado fisiológico.

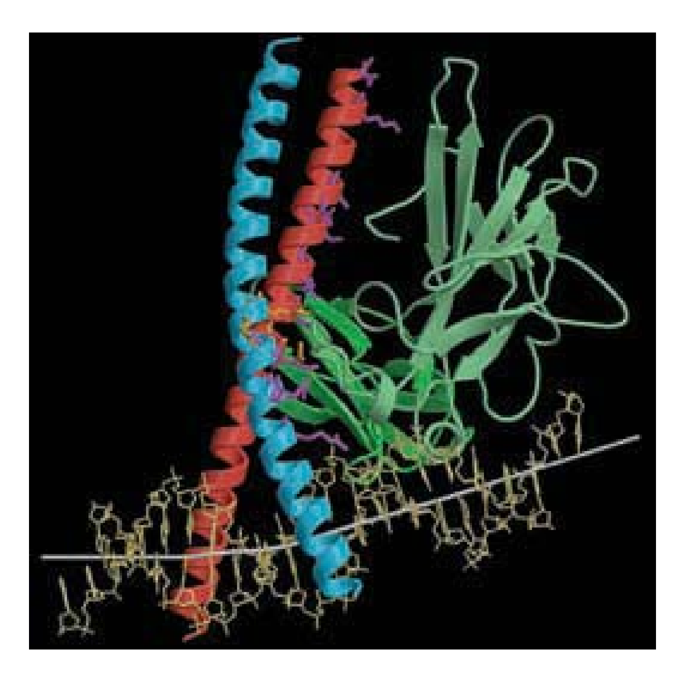


FIGURA 12-35 **Interacciones entre factores transcripcionales unidos a diferentes sitios en la región reguladora de un gen.** Esta imagen describe la estructura terciaria de dos factores de transcripción, NFAT-1 (verde) y AP-1 (cuyas dos subunidades se muestran en rojo y azul) unido al DNA corriente arriba de un gen de citocina que participa en la respuesta inmunitaria. La interacción cooperativa entre estas proteínas altera la expresión del gen de citocina. Las barras grises trazan la dirección de la hélice de DNA, que se dobla como resultado de la interacción proteína-proteína. (Tomada de Tom K. Kerppola, Structure 6:550, 1998.)

La estructura de los factores transcripcionales

La estructura tridimensional de diversos complejos DNA-proteína se determina por medio de la cristalografía de rayos X y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR), que proveen un esquema básico de la forma en que estas dos moléculas gigantes interactúan una con otra. Como la mayoría de las proteínas, los factores transcripcionales contienen diferentes

dominios que participan en aspectos distintos de la función de la proteína. Por lo general, los factores transcripcionales contiene al menos dos dominios: un *dominio de DNA que se enlaza* a secuencias específicas de pares de bases de DNA y un *dominio de activación* que regula la transcripción al interactuar con otras proteínas. Además muchos factores transcripcionales contienen una superficie que promueve la unión de la proteína con otras proteínas de estructura idéntica o similar para formar un dímero. Está demostrado que la formación de dímeros es una característica que muchos tipos de factores transcripcionales comparten y, como se discute más adelante, se cree que desempeña una función importante en la regulación de la expresión génica.

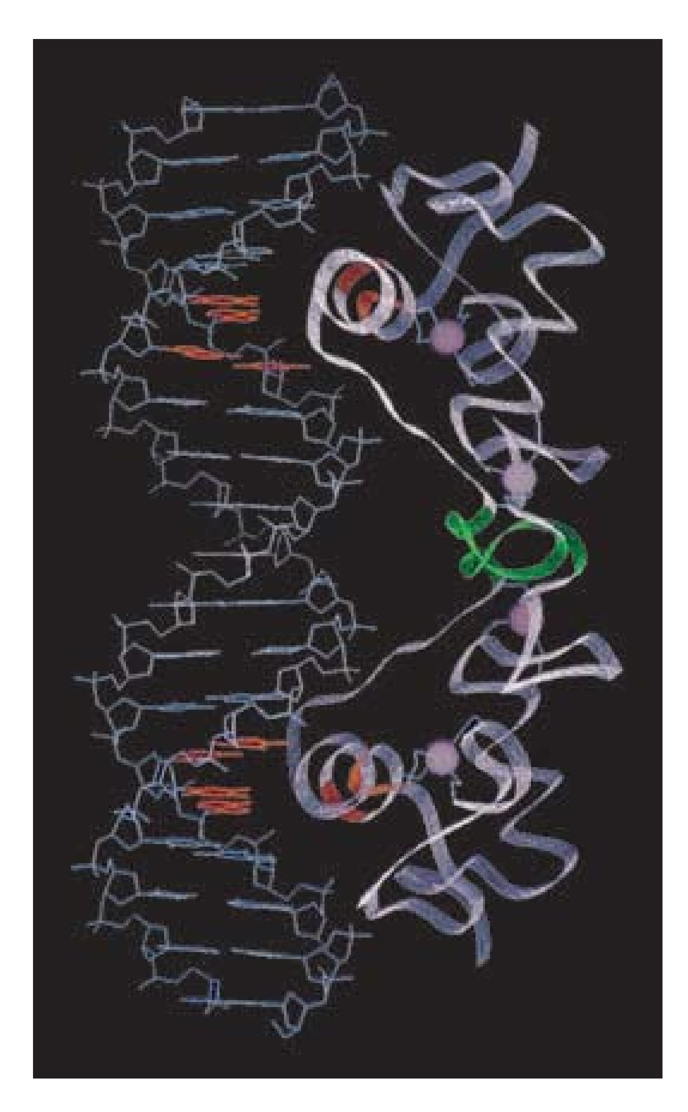


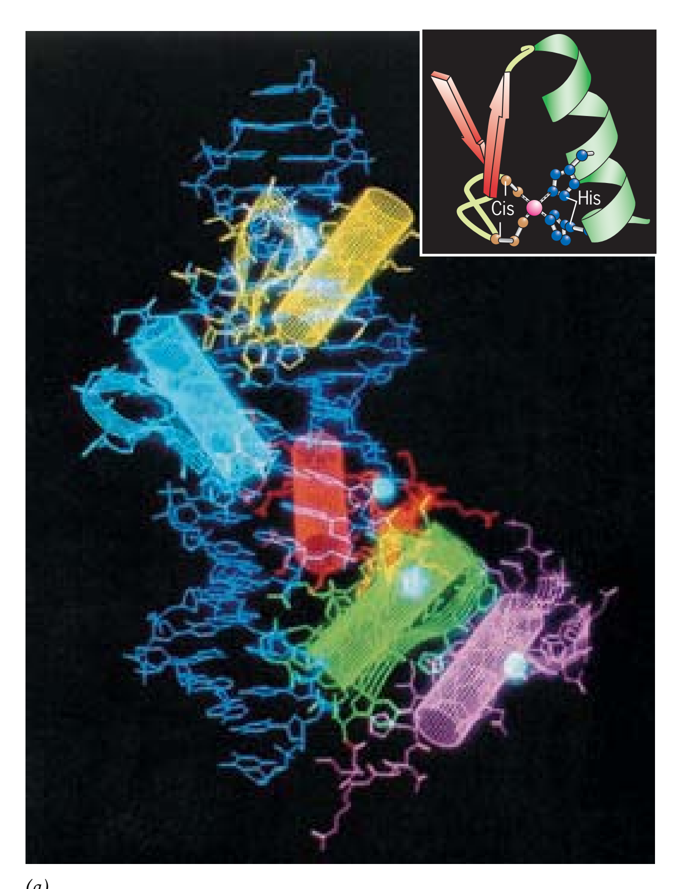
FIGURA 12-36 Interacción entre un factor de transcripción y su secuencia de DNA blanco. Un modelo de la interacción entre dos dominios de unión al DNA del receptor dimérico de glucocorticoide (GR) y el DNA blanco. Las dos hélices alfa, una de cada subunidad del dímero, se extienden de manera simétrica en los dos surcos mayores adyacentes del DNA blanco. Los residuos en el dímero GR que son importantes para las interacciones entre los dos monómeros están coloreados de verde. Los cuatro iones de cinc (dos por monómero) se muestran como esferas púrpuras. (REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE T. HÄRD ET AL., CORTESÍA DE ROBERT KAPTEIN, SCIENCE 249:159, 1990; © DERECHOS RESERVADOS 1990, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE.)

Estructuras relacionadas de factores transcripcionales

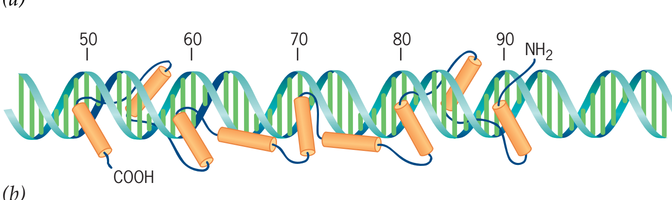
Los dominios de unión de DNA de la mayoría de estos factores pueden agruparse en diferentes clases cuyos miembros poseen estructuras relacionadas (*motifs*) que interactúan con secuencias de DNA. La existencia de varias familias de proteínas de unión de DNA indica que la evolución encontró diversas soluciones para el problema de la construcción de polipéptidos que pueden unirse a la doble hélice de DNA. Como se verá, la mayoría de estas estructuras contiene un segmento (a menudo una hélice alfa, como se muestra en la figura 12-36) que se inserta en el surco mayor del DNA, donde se reconoce la secuencia de pares de bases que se localizan en el surco. La unión de la proteína al DNA se realiza mediante una combinación específica de fuerzas de van der Waals, enlaces iónicos y puentes de hidrógeno entre los residuos de aminoácidos y diferentes segmentos del DNA, inclusive el esqueleto.

Las estructuras relacionadas más frecuentes que se observan en las proteínas que unen DNA eucariota comprenden los dedos de cinc, la hélice-asa-hélice, la cremallera de leucina y la caja HMG. Cada una provee una estructura estable en que las superficies de la proteína que reconocen el DNA pueden posicionarse de manera apropiada para interactuar con la doble hélice.

1. ***La estructura dedos de cinc.*** La clase más grande de factores transcripcionales contiene una estructura que se conoce como *dedos de cinc*. En la mayoría de los casos el ion de cinc de cada dedo se coordina con dos cisteínas y dos histidinas. Los dos residuos de cisteína son parte de una hoja beta plegada de dos cadenas en un lado del dedo de cinc y los dos residuos de histidina forman parte de una hélice alfa corta en el lado opuesto del dedo (recuadro de la figura 12-37*a*). Por lo general estas proteínas tienen cierto número de tales dedos que actúan de manera independiente uno de otro y están espaciados para proyectarse en los sucesivos surcos mayores del DNA blanco, como se ilustra en la figura 12-37*a*. La primera proteína dedo de cinc que se descubrió, el factor TFIIIA, tiene nueve dedos de cinc (fig. 12-37*b*). Otros factores transcripcionales de dedos de cinc incluyen Egr, que participa en la activación de los genes que se requieren para la división celular, y GATA, que participa en el desarrollo del músculo cardiaco. La comparación de diferentes proteínas dedo de cinc indica que la estructura provee un marco estructural para una amplia variedad de secuencias de aminoácidos que reconocen un grupo diverso de secuencias de DNA.
2. ***Estructura hélice-asa-hélice (HLH).*** Como su nombre lo indica, se caracteriza por dos segmentos de hélice alfa separados por un asa intermedia. A menudo el dominio HLH es precedido por un grupo de aminoácidos muy básicos cuyas cargas positivas de las cadenas laterales hacen contacto con el DNA y determinan la especificidad de secuencia del factor transcripcional. Las proteínas con esta HLH básica (o bHLH) siempre se presentan como dímeros, como se ilustra en el ejemplo del factor transcripcional MyoD en la figura 12-38. Genes distintos suelen codificar las dos subunidades del dímero, lo que determina que la proteína sea un heterodímero.

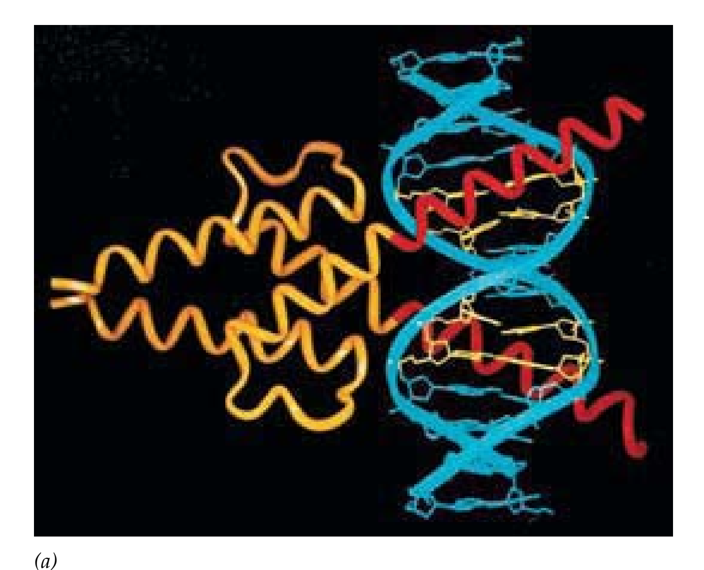


(a)

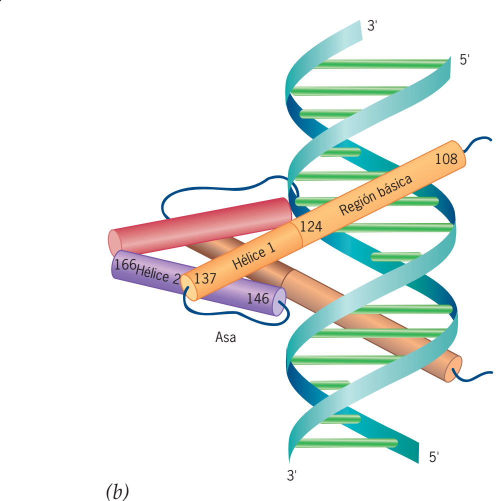


(b)

FIGURA 12-37 Factores transcripcionales que se unen por medio de una estructura dedo de cinc. *a*) Modelo del complejo entre una proteína con cinco dedos de cinc (llamados GLI) y DNA. Cada uno de estos dedos de cinc es de color diferente; el DNA se muestra en azul oscuro; los cilindros y los listones destacan las hélices alfa y las hojas beta, respectivamente. El recuadro muestra la estructura de un solo dedo de cinc. *b*) Modelo de TFIIIA unido al DNA del gen 5S RNA. TFIIIA se requiere para la transcripción del gen 5S rRNA mediante la polimerasa de RNA III. (*A*, reimpresa con autorización de Nikola Pavletich y Carl O. Pabo, Science 261:1702, 1993; © derechos reservados 1993, American Association for the Advancement of Science; *B*, tomada de K. R. Clemens et al., Proc Nat'l Acad Sci USA 89:10825, 1992.)



(a)



(b)

FIGURA 12-38 Un factor transcripcional con una estructura hélice-asa-hélice básica (bHLH). *a*) MyoD, un factor transcripcional dimérico que participa en la activación de la diferenciación muscular, es una proteína bHLH que se une al DNA por una asociación de su región básica. El sitio de unión a 14 pares de bases en el DNA se muestra en azul. La región básica de cada monómero de MyoD se representa en rojo, mientras que la región hélice-asa-hélice de cada monómero de MyoD se muestra en café. Las bases de DNA unidas mediante el factor de transcripción se indican en amarillo. *b*) Esquema del complejo dimérico MyoD en la misma orientación que en la parte *a*. Las hélices alfa se representan como cilindros. (Tomada de P. C. M. Ma et al., cortesía de Carl O. Pabo, Cell 77:453, 1994; con autorización de Cell Press.)

La heterodimerización expande mucho la diversidad de factores de regulación que pueden generarse a partir de un número limitado de polipéptidos (fig. 12-39). Supóngase, por ejemplo, que una célula sintetiza cinco polipéptidos que contienen bHLH distintas que fueron capaces de formar heterodímeros entre sí en cualquier combinación; por tanto pueden generarse 32 (2^5) combinaciones de factores transcripcionales diferentes que reconocen 32 secuencias de DNA distintas. En realidad es probable que las combinaciones entre los polipéptidos estén restringidas, de manera semejante a la formación de las moléculas de integrina heterodiméricas (pág. 248).

Los factores transcripcionales que contienen HLH desempeñan una función clave en la diferenciación de ciertos tipos de tejidos, inclusive el músculo esquelético (como se ilustra en la figura 12-33). Los factores transcripcionales que contienen HLH también participan en el control de la proliferación celular y al parecer en la generación de ciertos tipos de cáncer. Como se señaló en la página 502, las transloca-

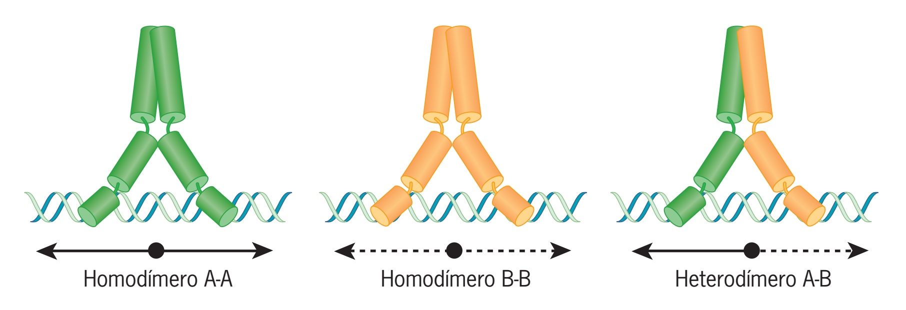
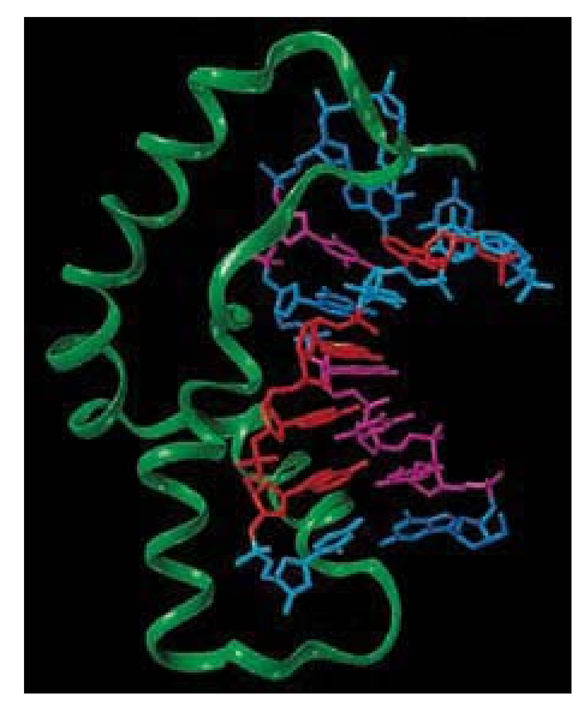


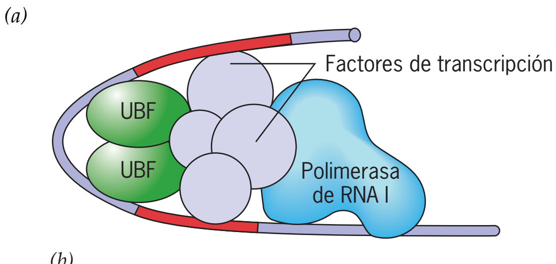
FIGURA 12-39 Incremento de la unión al DNA a través de factores de transcripción específicos por medio de la dimerización. En este modelo de una proteína HLH, tres diferentes factores de transcripción diméricos que reconocen distintos sitios de unión al DNA pueden formarse cuando dos subunidades se vinculan en combinaciones diferentes.

ciones cromosómicas pueden generar genes anormales cuya expresión ocasiona que la célula se convierta en cancerosa. Los genes que codifican por lo menos cuatro diferentes proteínas bHLH (Myc, SCL, LYL-1 y E2A) se encuentran en las translocaciones cromosómicas que conducen al desarrollo de cánceres específicos. El más prevalente de estos cánceres es el linfoma de Burkitt en el que el gen *MYC* del cromosoma 8 se transloca a un locus en el cromosoma 14 que contiene el sitio de regulación para un gen que codifica parte de una molécula de anticuerpo. Se supone que la expresión excesiva del gen *MYC* en su nueva localización es un factor importante para el desarrollo de este linfoma.

3. ***La estructura cremallera de leucina.*** Su nombre se deriva del hecho de que las leucinas están presentes cada siete aminoácidos a lo largo de la secuencia de la hélice alfa. Puesto que una hélice alfa se repite cada 3.5 residuos, todas las leucinas a lo largo de esta secuencia de polipéptido se encuentran en la misma dirección. Dos de las hélices alfa de este tipo son capaces de juntarse en una cremallera para formar una *estructura superenrollada*. Por tanto, como casi todos los factores transcripcionales, las proteínas con estructura cremallera de leucina existen como dímeros. La cremallera de leucina puede unir DNA porque contiene un grupo de aminoácidos básicos en un lado de la hélice alfa que contiene leucina. El segmento básico y la cremallera de leucina juntos se refieren como estructura *bZIP*. En consecuencia, como las proteínas bHLH, las porciones de hélice alfa de las proteínas bZIP son importantes en la dimerización, en tanto que el grupo de aminoácidos básicos permite a la proteína reconocer una secuencia nucleotídica específica en el DNA. AP-1, cuya estructura e interacción con el DNA se muestra en la figura 12-35, es un ejemplo de factor transcripcional tipo bZIP. AP-1 es un heterodímero cuyas dos subunidades (Fos y Jun, mostradas en rojo y azul, respectivamente en la figura 12-35) son codificadas por los genes *FOS* y *JUN*. Estos dos genes desempeñan una función importante en la proliferación celular y su mutación puede ocasionar que la célula se convierta en maligna. Las mutaciones en cualquiera de los dos genes que impiden que las proteínas formen heterodímeros también impiden que las proteínas se unan al DNA, lo que indica la importancia de la formación de dímeros en la regulación de su actividad como factores transcripcionales.
4. ***La estructura caja HMG.*** La caja HMG recibe su nombre de un gran grupo de proteínas abundantes, llamado grupo de proteínas de alta movilidad (HMG), en el que se descubrió por primera vez. Consiste en tres hélices alfa organizadas en estructuras en forma de *boomerang* capaz de unir DNA, como se muestra en la figura 12-40*a*. Los factores transcripcionales que poseen cajas HMG se definen como factores "arquitectónicos"; activan la transcripción mediante el doblamiento de DNA, lo que al parecer promueve la interacción de otros



(*a*)



(*b*)

FIGURA 12-40 Proteínas HMG que doblan el DNA. *a*) Modelo que muestra una porción de la proteína HMG humana SRY (color verde) unida al DNA (color azul/rojo). La unión de la proteína induce una formación de asa en el DNA, que se acopla a la superficie cóncava de la caja HMG. El doblez ocurre conforme la proteína hace contacto con el surco menor del DNA y se inserta en la cadena lateral de un residuo de isoleucina entre un par de bases específico. *b*) UBF es un factor transcripcional dimérico que dobla el DNA y lo convierte en un molde para la polimerasa de RNA I. La unión de la polimerasa de RNA I requiere diferentes factores transcripcionales generales, no distintos de los necesarios para la unión de la polimerasa de RNA II con la caja TATA en estos promotores. (*A*, TOMADA DE MILTON H. WERNER ET AL., CORTESÍA DE G. M. CLORE Y A. M. GRONENBORN, CELL 81:707, 1995; CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS.)

factores transcripcionales unidos a sitios muy cercanos (fig. 12-40*b*). La proteína HMG denominada SRY, que se muestra en la figura 12-40*a*, tiene una participación importante en la diferenciación sexual en humanos masculinos. La proteína SRY, que codifica un gen del cromosoma Y, activa la transcripción de genes en una vía que lleva a la diferenciación de los testículos. Las mutaciones en el gen SRY que generan proteínas incapaces de unirse a DNA causan un trastorno que se conoce como "inversión sexual". Los individuos con este fenotipo tienen un par de cromosomas sexuales XY pero se desarrollan como mujeres.

Una proteína HMG distinta llamada UBF, que se ilustra en la figura 12-40*b*, se une al DNA como un dímero cuyas dos subunidades contienen un total de 10 cajas HMG. A fin de interactuar con sitios sucesivos a lo largo del DNA, las cajas HMG distorsionan la hélice de DNA para que sus asas rodeen la proteína. Las asas de DNA exponen dos secuencias de DNA reguladoras que en condiciones normales están separadas por 120 pares de bases en la proximidad, donde pueden unirse en forma cooperativa mediante uno o más factores transcripcionales.

Sitios de DNA que participan en la regulación de la transcripción

La complejidad inherente en el control de la transcripción de genes puede ilustrarse con el examen del DNA en y alrededor de un solo gen. La explicación siguiente se enfoca en el gen que codifica la enzima carboxicinasa de fosfoenolpiruvato (PEPCK). La PEPCK es una de las enzimas clave de la gluconeogénesis, la vía metabólica que convierte el piruvato en glucosa (véase fig. 3-31). La enzima se sintetiza en el hígado cuando los niveles de glucosa son bajos, por ejemplo, como ocurre en el ayuno prolongado. En cambio, la síntesis de la enzima decae de manera importante después de ingerir una comida rica en carbohidratos, como una pasta. El nivel de síntesis de mRNA de *PEPCK* está controlado por una variedad de factores de transcripción diferentes, inclusive algunos receptores de hormonas que participan en la regulación del metabolismo de los carbohidratos. La clave para entender la regulación del gen *PEPCK* y su expresión reside en: 1) descubrir las funciones de numerosas secuencias de DNA reguladoras que se localizan corriente arriba del gen mismo, 2) identificar los factores transcripcionales que se unen a estas secuencias y 3) dilucidar las vías de señalización que activan la maquinaria que se encarga de la expresión selectiva del gen (que se discute en el capítulo 15).

La secuencia de regulación más próxima corriente arriba del gen *PEPCK* es la caja TATA, el elemento principal del promotor del gen (fig. 12-41). Como se explica en la página 445, un **promotor** es una región corriente arriba de un gen que regula el inicio de la transcripción.[9] Para los propósitos de esta obra los promotores eucariotas se dividirán en regiones separadas, que no están bien delineadas. La región que se extiende desde la caja TATA al sitio de inicio de la transcripción se denomina el *promotor nuclear*. El promotor nuclear es el sitio de ensamble de un complejo de preiniciación que consiste en polimerasa de RNA

[9] Una cantidad significativa de los genes de los mamíferos (quizá 15%) tiene más de un promotor (esto es, promotores alternos), lo cual permite que el inicio de la transcripción ocurra en más de un sitio corriente arriba de un gen. En algunos casos, los promotores alternos se usan en diferentes tejidos pero causan la síntesis del mismo polipéptido. En otros casos, los promotores alternativos promueven la síntesis de proteínas afines. En muchas ocasiones rigen la transcripción de mRNA que se traducen en diferentes marcos de lectura (pág. 470) para producir polipéptidos del todo distintos.

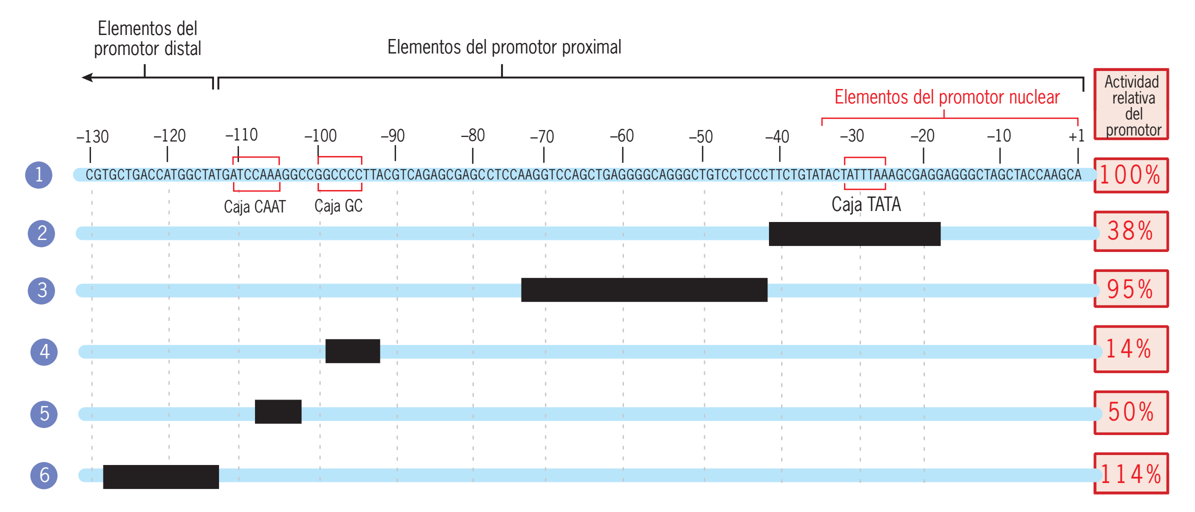


FIGURA 12-41 Identificación de secuencias promotoras necesarias para la transcripción. La línea 1 muestra la secuencia nucleotídica de una cadena del promotor del gen *PEPCK*. Se ilustran las cajas TATA, CAAT y GC. Las otras cinco líneas muestran los resultados de experimentos en los que las regiones de los promotores se eliminaron (lo que se indica mediante recuadros negros) antes de la transfección de las células con el DNA. El nivel de transcripción del gen *PEPCK* que se observa en cada uno de estos casos se indica a la derecha. Las deleciones que remueven toda o parte de las tres cajas causan una marcada disminución en el nivel de transcripción, en tanto que las deleciones que afectan otras regiones tienen poco o ningún efecto. (Nótese que muchos promotores de mamíferos carecen de uno o más de estos elementos, inclusive la caja TATA. Los promotores que carecen de la caja TATA a menudo tienen un elemento conservado en una posición corriente abajo del sitio de unión, llamado *elemento promotor corriente abajo* o *DPE*.) (DATOS TOMADOS DE LOS ESTUDIOS DE RICHARD W. HANSON Y DARYL K. GRANNER Y COLABORADORES.)

II y diferentes factores transcripcionales que se necesitan antes de que un gen eucariota pueda transcribirse.

La caja TATA no es la única secuencia que se encuentra en gran número de genes. Dos secuencias promotoras más, llamadas caja CAAT y caja GC, que se localizan un poco más corriente arriba del gen, suelen requerirse para que una polimerasa de DNA inicie la transcripción del gen. La caja CAAT y la caja GC se unen con factores transcripcionales (p. ej., NF1 y SP1) que se encuentran en muchos tejidos y se utilizan con amplitud en la expresión génica. Mientras que la caja TATA determina el sitio de inicio de la transcripción, las cajas CAAT y GC regulan la frecuencia con que la polimerasa transcribe el gen. Las cajas TATA, CAAT y GC, cuando están presentes, casi siempre se localizan dentro de los 100 a 150 pares de bases, corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Por su proximidad con el inicio del gen, estas secuencias compartidas pueden denominarse *elementos próximos al promotor*, y se indican en la línea 1 de la figura 12-41.

¿Qué hacen los investigadores para identificar qué sitios en el genoma interactúan con un factor de transcripción particular? Con frecuencia se emplean las siguientes estrategias para hacer esta determinación.

- **Mapeo por deleción.** En este procedimiento las moléculas de DNA se preparan para que contengan deleciones de diferentes partes del promotor del gen (fig. 12-41). Las células luego se transfectan con las moléculas de DNA alterado; esto es, se ocasiona que las células capten el DNA del medio. Por último se determina la capacidad de las células para transcribir el DNA transfectado. En muchos casos la deleción de unos cuantos nucleótidos tiene poco o ningún efecto en la transcripción del gen adyacente. Sin embargo, si la deleción se localiza dentro de cualesquiera de las tres cajas antes descritas, el nivel de la transcripción tiende a reducirse (como en las líneas 2, 4 y 5 de la figura 12-41). Las deleciones en otras partes del promotor tienen un efecto menor sobre la transcripción (líneas 3 y 6 de la figura 12-41).
- **Técnica de *footprinting* de DNA (técnica de huellas digitales de DNA).** Cuando un factor de transcripción se une a una secuencia de DNA, éste protege la secuencia contra la digestión por nucleasas. Los investigadores aprovechan esta propiedad al aislar la cromatina de las células y tratarlas con enzimas que digieren el DNA, como la DNasa I, que destruye secciones del DNA que no están protegidas por la unión con el factor transcripcional. Una vez que la cromatina se digiere, la proteína unida se remueve y las secuencias de DNA protegidas se identifican.
- **Análisis de localización en el genoma completo.** Como su nombre lo indica, esta estrategia permite a los investigadores vigilar al mismo tiempo todos los sitios dentro del genoma que realizan una actividad específica. En este caso el objetivo es identificar todos los sitios que se unen con un factor transcripcional bajo condiciones fisiológicas. La figura 12-42 muestra un resumen de esta estrategia. Para efectuar este análisis las células se cultivan bajo las condiciones deseadas o se aíslan de un tejido particular o un estado del desarrollo y después se tratan con un agente, como el formaldehído, que fija las células y forma uniones cruzadas entre los factores transcripcionales y los sitios del DNA en los que éstos se unen en la célula viva (paso 1, fig. 12-42). Tras este paso de unión cruzada la cromatina celular se aísla, se rompe mecánicamente en pequeños fragmentos y se somete a la acción de un anticuerpo que se une de manera específica con los facto-

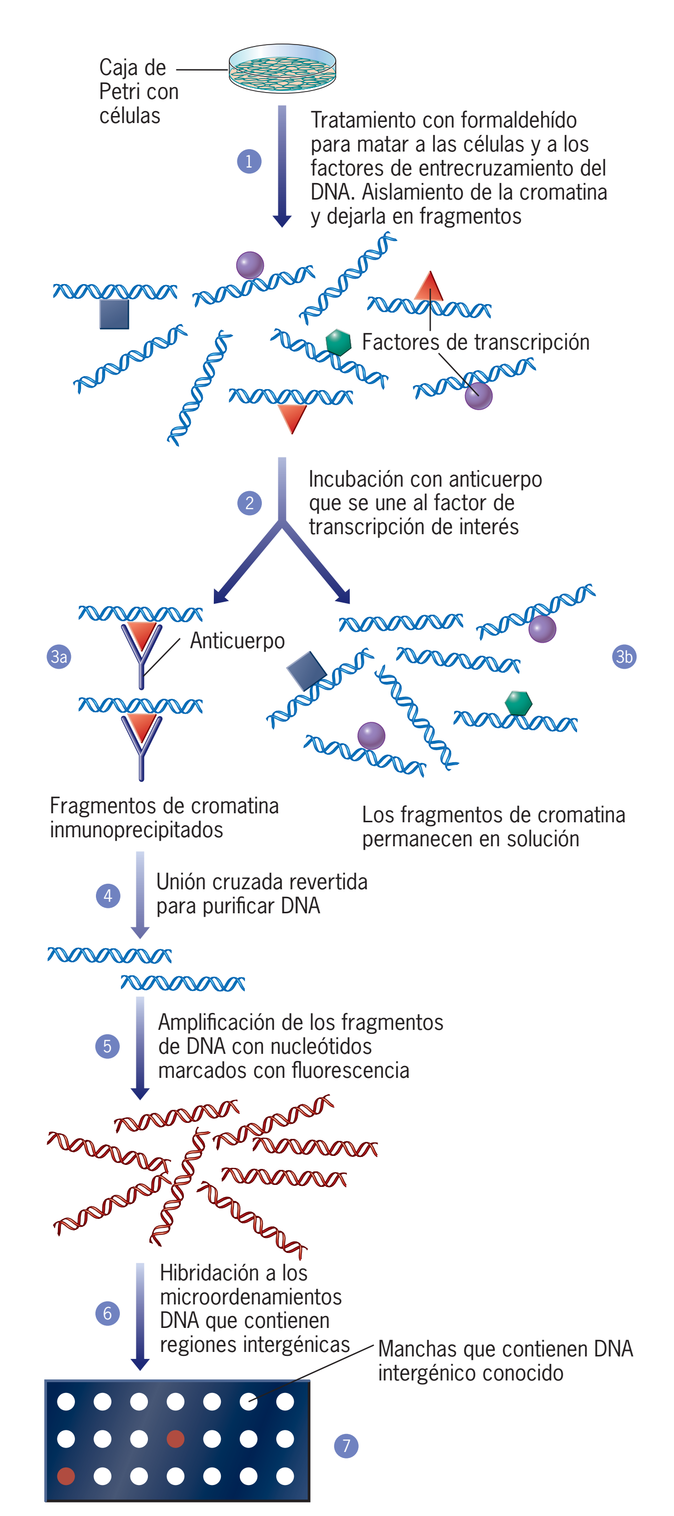


FIGURA 12-42 Uso de la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y análisis de microordenamientos para identificar el sitio de unión de factores transcripcionales a escala global. Los pasos se describen en el texto.

res transcripcionales de interés (paso 2). Este tratamiento con anticuerpos induce la precipitación de fragmentos de cromatina que contienen el factor de transcripción unido (paso 3a), en tanto que se desechan todos los fragmentos de cromatina que no están unidos en la solución (paso 3b). Una vez que el proceso de *inmunoprecipitación de cromatina* (o *ChIP*) ocurrió, las uniones cruzadas entre la proteína y el DNA en el precipitado pueden revertirse y los segmentos de DNA purificarse (paso 4). A continuación los segmentos de DNA purificados se amplifican y marcan con fluorescencia (paso 5). El paso siguiente consiste en identificar en qué partes del genoma se localizan estos sitios de unión a factores se transcripción. Para hacer esta determinación se prepara un microordenamiento de DNA similar al observado en la figura 12-34. Sin embargo, a diferencia del microordenamiento de la figura 12-34 que contiene DNA que representa genes (p. ej., regiones codificadoras de proteínas), los microordenamientos que se usan en estos experimentos de ChIP contienen DNA preparado de las regiones intergénicas del genoma. (Recuérdese que las regiones intergénicas contienen los sitios de regulación.) Cada punto en el microordenamiento contiene DNA de una región intergénica específica identificada. El microordenamiento de DNA intergénico se incuba luego con fragmentos de DNA marcados con fluorescencia obtenidos de los experimentos de ChIP (paso 6) y los sitios del microordenamiento que contienen DNA fluorescente unido se determinan (paso 7). Resulta interesante el hecho de que cuando estos tipos de experimentos se realizan con factores de transcripción de mamífero, un porcentaje significativo de los sitios de unión a DNA se localizan a distancia considerable de los promotores conocidos. Se especula que algunos de estos sitios participan en la regulación de la transcripción de RNA no codificadores, como los microRNA que se analizan en la página 462. Están en marcha planes para mapear los sitios de unión de todos los factores de transcripción conocidos de los mamíferos, lo que proporcionará un cuerpo de conocimiento acerca de las redes reguladoras que operan para controlar de manera coordinada la transcripción de miles de genes.

El receptor de glucocorticoides: un ejemplo de activación transcripcional Las diferentes hormonas que afectan la expresión del gen *PEPCK* comprenden la insulina, la hormona tiroidea, el glucagon y los glucocorticoides, todos los cuales actúan por medio de factores transcripcionales específicos que se unen al DNA. Los sitios en los que estos factores transcripcionales se unen a la región flanqueante del gen *PEPCK* se denominan **elementos de respuesta** y se muestran en la figura 12-43. La siguiente explicación se enfoca en los glucocorticoides, un grupo de hormonas esteroideas (p. ej., cortisol) que las glándulas suprarrenales sintetizan. Los análogos de estas hormonas, como la prednisolona, se prescriben como agentes antiinflamatorios potentes.

La secreción de glucocorticoides es mucho más alta durante los periodos de estrés, como en el ayuno o después de un daño físico intenso. Una célula que responde a los glucocorticoides debe poseer un receptor específico capaz de unir la hormona. El *receptor de glucocorticoides* (*GR*) es un miembro de una superfamilia de receptores nucleares (que incluye los receptores de hormonas tiroideas, ácido retinoico y estrógeno) que al parecer evolucionaron a partir de una proteína ancestral común. Los

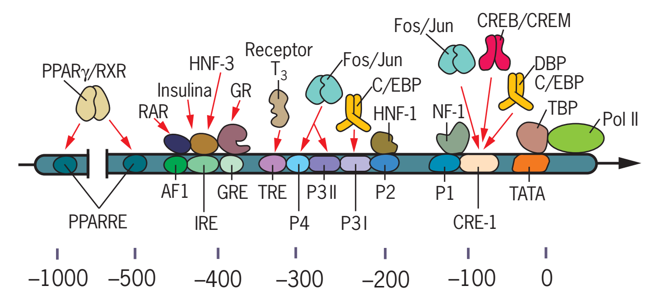


FIGURA 12-43 Regulación de la transcripción del gen de rata *PEPCK*. La transcripción de este gen, como la de otros, está controlada por una variedad de factores transcripcionales que interactúan con secuencias específicas del DNA localizadas en una región reguladora corriente arriba de la región del gen codificante. En esta región se encuentra un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) que, cuando se une con un receptor de glucocorticoides, estimula la transcripción del promotor. También incluidos en la región reguladora se hallan los sitios de unión para el receptor de hormona tiroidea (marcado como TRE), una proteína que se une a AMP cíclico, que se produce en respuesta a la hormona glucagon (marcada como CRE-1) y la hormona insulina (marcada como IRE). Otros factores transcripcionales se unen a los sitios de regulación en esta región corriente arriba del gen *PEPCK*. (TOMADA DE S. E. NIZIELSKI ET AL., J NUTRITION 126:2699, 1996; © AMERICAN SOCIETY FOR NUTRITIONAL SCIENCES.)

miembros de esta superfamilia son más que receptores hormonales, también funcionan como factores de transcripción que se unen al DNA. Cuando una hormona glucocorticoide entra a una célula blanco se une con la proteína receptora de glucocorticoide en el citosol y cambia la conformación de la proteína. Este cambio expone una señal de localización nuclear (pág. 488), que facilita la translocación del receptor hacia el núcleo (fig. 12-44). El receptor unido al ligando se vincula con una secuencia específica del DNA, llamada *elemento de respuesta a glucocorticoides* (*GRE*), que se localiza corriente arriba del gen *PEPCK* y activa la transcripción de este gen. Los incrementos en el nivel de PEPCK promueven la conversión de aminoácidos en glucosa. La misma secuencia de GRE se localiza corriente arriba de diferentes genes en cromosomas distintos. En consecuencia, un estímulo único (concentraciones elevadas de glucocorticoides) puede activar de manera simultánea diferentes genes cuya función se requiere para responder al estrés.

Los elementos de respuesta a glucocorticoides consisten en la siguiente secuencia

5′-AGAACAnnnTGTTCT-3′
3′-TCTTGTnnnACAAGA-5′

donde n puede ser cualquier nucleótido. (Una secuencia simétrica de este tipo se conoce como *palíndromo* porque las dos cadenas tienen la misma secuencia 5′ a 3′.) Se sabe que el GRE consta de dos grupos de nucleótidos definidos separados por tres nucleótidos no definidos. La estructura doble del GRE es importante porque los pares de polipéptidos GR se unen al DNA para formar dímeros en los que cada subunidad del dímero se une a una mitad de la secuencia de DNA que se indica arriba (véase fig. 12-36). La importancia del GRE en la mediación de la respuesta a una hormona se demuestra de manera más clara si una de estas secuencias se introduce en una región corriente arriba

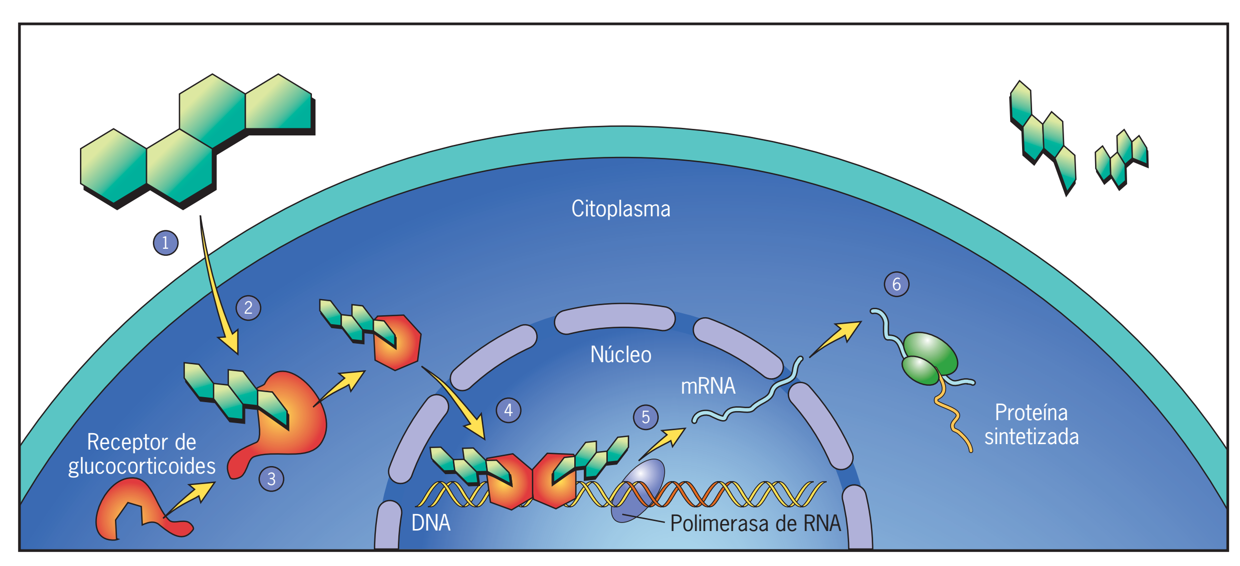


FIGURA 12-44 Activación de un gen por una hormona esteroide, como el glucocorticoide cortisol. La hormona entra a la célula desde el líquido extracelular (paso 1), se difunde a través de la bicapa lipídica (paso 2) y entra al citoplasma, donde se une con el receptor de glucocorticoides (paso 3), lo que ocasiona su translocación hacia el núcleo, donde actúa como factor transcripcional y se une al elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) del DNA (paso 4). La unión de dos moléculas de receptor adyacentes conduce a la formación de un dímero, que activa la transcripción del DNA (paso 5), y a la síntesis de proteínas específicas en el citoplasma (paso 6).

de un gen que en condiciones normales no responde al glucocorticoide. Cuando las células que contienen DNA manipulado en esta forma se exponen a glucocorticoides, la transcripción que se encuentra corriente abajo del GRE trasplantado se inicia. La figura 18-47 presenta la evidencia visual de que la transcripción del gen puede estimularse mediante regiones reguladoras externas.

Activación transcripcional: función de los aumentadores, promotores y coactivadores

Los GRE situados corriente arriba del gen *PEPCK* y otros elementos de respuesta que se ilustran en la figura 12-43 se consideran parte del promotor; se refieren como *elementos distales del promotor* para distinguirlos de los elementos proximales situados muy cerca del gen (fig. 12-41). La expresión de la mayoría de los genes también se regula mediante elementos distantes del DNA llamados **aumentadores** (*enhancers*). Por lo general un aumentador se extiende cerca de 200 pares de bases y contiene múltiples sitios de unión para activadores transcripcionales específicos de secuencia. Los aumentadores se diferencian de los elementos del promotor por una propiedad única: pueden cambiarse experimentalmente de un lugar a otro dentro de una molécula de DNA o aun invertirse (rotarse 180°), sin afectar la capacidad de unión de los factores transcripcionales para estimular la transcripción. La deleción de un aumentador puede disminuir el nivel de transcripción alrededor de 100 veces o mucho más. Un gen típico de mamífero puede tener diferentes aumentadores diseminados en el DNA en la vecindad del gen. Por lo general diferentes aumentadores unen distintos grupos de factores transcripcionales y responden de manera independiente a estímulos diversos. Algunos aumentadores se localizan miles o decenas de miles de pares de bases corriente arriba o corriente abajo del gen cuya transcripción estimulan.

Aun cuando los aumentadores y los promotores pueden estar separados por un gran número de nucleótidos, se cree que los aumentadores estimulan la transcripción mediante su influencia en fenómenos que ocurren en el promotor nuclear. Los aumentadores y los promotores nucleares pueden colocarse en proximidad estrecha por la intervención del DNA para formar un asa. El DNA puede mantenerse como asa mediante la interacción con proteínas de unión (fig. 12-45). Si los aumen-

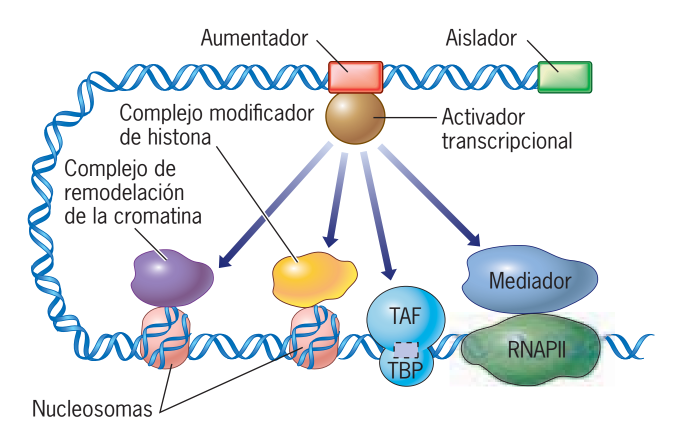


FIGURA 12-45 Estrategia por la que activadores de la transcripción unidos a sitios distantes pueden influir la expresión génica. Los activadores transcripcionales que se unen a los aumentadores, corriente arriba, influyen la expresión génica al interactuar con coactivadores. Aquí se muestran cuatro tipos distintos de coactivadores; dos de ellos, marcados como "complejo modificador de histona" y "complejo de remodelación de la cromatina", actúan mediante la alteración de la estructura de la cromatina. Los otros dos, marcados como "TAF" y "Mediador", actúan en componentes de la maquinaria de transcripción basal que se ensambla en el promotor nuclear. Estos diferentes tipos de coactivadores se discuten en las secciones siguientes.

tadores pueden interactuar con proteínas sobre distancias tan grandes, ¿qué es lo que evita que un aumentador se una a un promotor no apropiado que se localiza también corriente abajo en la molécula del DNA? En esencia un promotor y sus aumentadores se aíslan de otros elementos promotor/aumentador por medio de secuencias de unión especializadas conocidas como **aisladores**. Según el modelo conocido, las secuencias aisladoras se unen a proteínas de la matriz nuclear y los segmentos de DNA entre los aisladores corresponden a los dominios de asa que se describen en la figura 12-13.

Una de las áreas más activas de la biología molecular en el decenio pasado se enfocó en los mecanismos por los que la unión de un factor transcripcional a un aumentador estimula el inicio de la transcripción en el promotor nuclear. Los factores de transcripción realizan esta tarea por la acción de intermediarios conocidos como **coactivadores**. Los coactivadores son grandes complejos que constan de numerosas subunidades. Los coactivadores pueden dividirse en dos amplios grupos según su función: 1) los que interactúan con componentes de la maquinaria de transcripción basal (los factores generales de la transcripción y la polimerasa de RNA II) y 2) los que actúan a nivel de la cromatina y la convierten de un estado hasta cierto punto inaccesible para la maquinaria de transcripción en un estado mucho más "accesible". La figura 12-45 muestra un esquema de cuatro tipos de coactivadores, dos de cada uno de los principales grupos. Estos diferentes tipos de coactivadores trabajan juntos de manera ordenada para activar la transcripción de un gen en respuesta a señales intracelulares específicas. Con base en el gran número de factores de transcripción codificados en el genoma y la diversidad limitada de los coactivadores, cada complejo de coactivador opera en conjunto con una amplia variedad de factores transcripcionales. El coactivador CBP, por ejemplo, que se estudia más adelante, participa en las actividades de cientos de factores de transcripción distintos. Las mutaciones en el gen que codifica CBP pueden causar una enfermedad hereditaria, el síndrome de Rubinstein-Taybi, que se caracteriza por anormalidades esqueléticas y cardiacas así como retardo mental grave.

Coactivadores que interactúan con la maquinaria de transcripción basal La transcripción se realiza a través del reclutamiento y la colaboración posterior de grandes complejos proteicos. TFIID, uno de los GTF necesarios para que la transcripción inicie (pág. 445), consiste en una docena o más de subunidades que se conocen como TAF. Se cree que algunos factores de transcripción ejercen cierta influencia sobre eventos en el promotor nuclear al interactuar con una o más de estas subunidades de TFIID. Otro coactivador que permite la comunicación entre factores de transcripción que se unen al intensificador y la maquinaria de transcripción basal se conoce como Mediador. Éste es un enorme complejo de multisubunidades que interactúa con la polimerasa de RNA II. Es necesario para el funcionamiento de una amplia variedad de activadores de la transcripción y tal vez sea un elemento esencial en la transcripción de la mayoría de los genes que codifican proteína, si no es que de todos. El mecanismo de acción de Mediador sigue siendo mal definido.

Coactivadores que alteran la estructura de la cromatina Como se explica en la página 492, el DNA en un núcleo eucariota no se presenta en estado desnudo sino enrollado alrededor de octámeros de histona para formar nucleosomas. El descubrimiento de los nucleosomas en el decenio de 1970 generó una pregunta importante que aún no se resuelve de manera satisfactoria: ¿qué hace a las proteínas no histónicas (como los factores transcripcionales y las polimerasas de RNA) capaces de interactuar con el DNA que está muy compactado en los núcleos de histona? Un gran cuerpo de evidencia sugiere que de hecho la incorporación del DNA en los nucleosomas impide el acceso al DNA e inhibe tanto el inicio como las etapas de elongación de la transcripción. ¿De qué manera las células evitan este efecto inhibidor generado por la estructura de la cromatina?

Como se vio en la página 493, cada una de las moléculas de histona de un núcleo de nucleosoma tiene una cola N-terminal flexible que se extiende por fuera de la partícula nuclear y pasa la hélice del DNA. Las modificaciones covalentes de estas colas tienen efectos importantes en la estructura de la cromatina y su función. Ya se vio que la adición de grupos metilo en la histona nuclear H3 puede promover la compactación de la cromatina y el silenciamiento transcripcional (pág. 498). La adición de grupos acetilo a residuos específicos de lisina en las histonas nucleares tiene un efecto opuesto. Se piensa que, a gran escala, la acetilación de los residuos de histona evita que las fibras de cromatina formen estructuras plegadas y compactas, lo que ayuda a mantener activas las regiones de eucromatina. A una escala más fina, la acetilación de las histonas incrementa el acceso de regiones específicas del DNA molde para la interacción con proteínas, lo que promueve la activación de la transcripción. Los grupos acetilo se agregan a residuos de lisina específicos en las histonas nucleares mediante una familia de enzimas conocida como **acetiltransferasas de histonas** (**HAT**).

Al final del decenio de 1990 se descubrió que diferentes coactivadores poseen actividad de HAT. Si la actividad de HAT de estos coactivadores se elimina por mutación, también la capacidad para estimular la transcripción se pierde. El descubrimiento de que los coactivadores contienen actividad de HAT evidenció una relación crucial entre la acetilación de histonas, la estructura de la cromatina y la activación génica. La figura 12-46 muestra la serie ordenada de reacciones que se propone ocurren después de la unión de un factor transcripcional, como sucede con el receptor de glucocorticoides y su elemento de respuesta en el DNA. Una vez que se une al DNA, el activador recluta un coactivador (p. ej., CBP) hacia una región de la cromatina que se selecciona para la transcripción. Tras posicionarse en la región blanco, el coactivador acetila las histonas nucleares de los nucleosomas cercanos, lo que crea un sitio de unión para el complejo de remodelación de la cromatina (que se discute más adelante). Las acciones combinadas de estos diferentes complejos incrementan la accesibilidad del promotor a los componentes de la maquinaria de transcripción, que se ensambla en el sitio donde la transcripción tendrá inicio.

La figura 12-46 muestra la actividad de dos coactivadores que afectan el estado de la cromatina. Ya se vio cómo las HAT actúan para modificar las colas de histona, ahora se estudiará en forma más detallada el otro tipo de coactivadores, los **complejos de remodelación de la cromatina**. Estos complejos usan la energía liberada por la hidrólisis de ATP para modificar la estructura y localización de los nucleosomas. Esto a su vez puede permitir que los factores de transcripción y otras proteínas se fijen a sitios reguladores en el DNA. Las "máquinas" que participan en la remodelación de la cromatina mejor estudiadas son

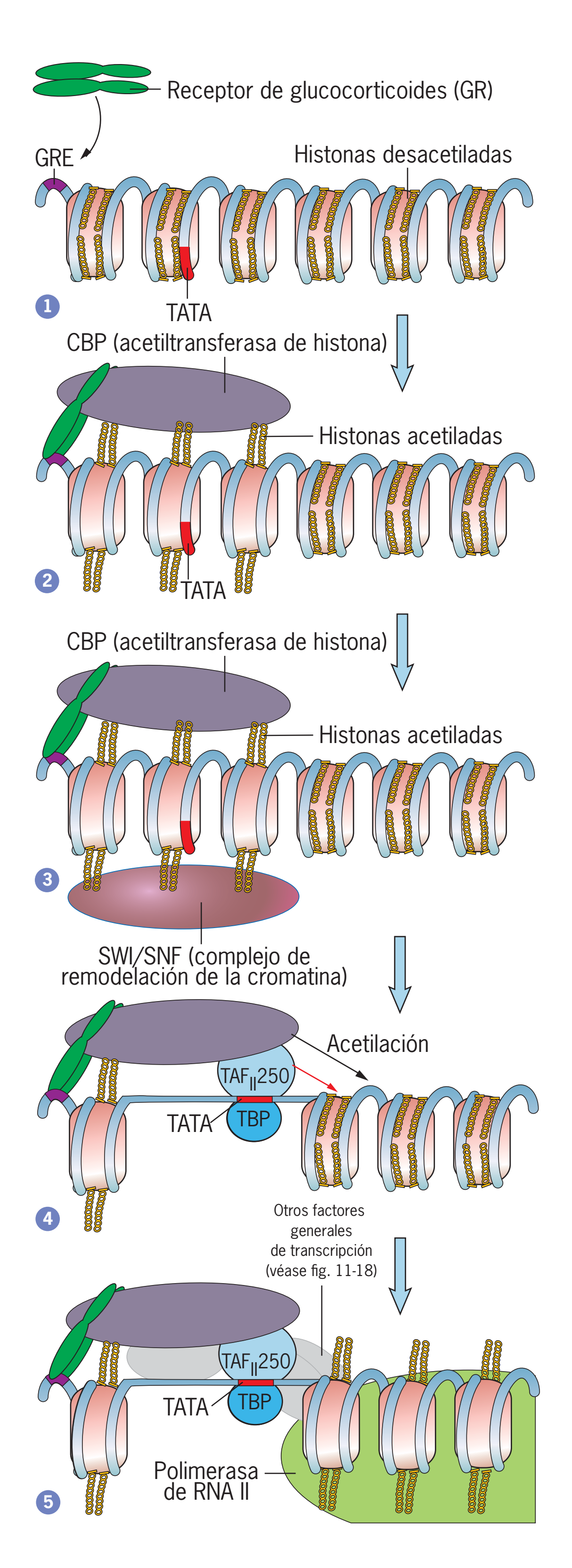


FIGURA 12-46 Un modelo de los fenómenos que ocurren en el promotor después de la unión de un activador transcripcional. Los factores de transcripción, como el receptor de glucocorticoides (GR), se unen al DNA y reclutan coactivadores, lo que facilita el ensamble del complejo de pre-inicio de la transcripción. El paso 1 de este esquema muestra una región de un cromosoma que se encuentra en un estado reprimido a causa de la vinculación de este DNA con desacetilasas de histonas. En el paso 2 el GR se une al GRE y el coactivador CBP se recluta. CBP contiene una subunidad con actividad de acetiltransferasa de histona (HAT). Estas enzimas transfieren grupos acetilo de un donante acetil CoA a los grupos amino de residuos específicos de lisina. Como resultado, las histonas de las partículas nucleares del nucleosoma en las regiones corriente arriba y corriente abajo de la caja TATA se acetilan. En el paso 3 las histonas acetiladas reclutan SWI/SNF, que es un complejo de remodelación de la cromatina. Los dos coactivadores CBP y SWI/SNF juntos convierten la estructura de la cromatina en un estado más abierto y accesible. En el paso 4 el factor TFIID se une a la región abierta del DNA. Aunque no se menciona en el texto, una de las subunidades de TFIID (llamada TAF$_{II}$250 o TAF1) también posee actividad de acetiltransferasa de histona como lo indica la flecha roja. Juntos, CBP y TF$_{II}$250 modifican nucleosomas adicionales para permitir que la transcripción inicie. En el paso 5 los nucleosomas remanentes del promotor se acetilan, la polimerasa de RNA II se une al promotor y la transcripción está próxima a iniciar.

miembros de la familia SWI/SNF, que se muestran en la figura 12-46. Los complejos SWI/SNF consisten en nueve a 12 subunidades, inclusive la proteína actina, cuya presencia en el núcleo ha sido tema de debate por años. Se especula que la actina puede unir el complejo de remodelación con la matriz nuclear. Al parecer los complejos SWI/SNF se reclutan en promotores específicos por vías diferentes. En la figura 12-46 el coactivador CBP acetiló las histonas nucleares y generó un sitio de unión de alta afinidad para el complejo de remodelación. Se cree que, una vez que los complejos de remodelación de la cromatina se reclutan en el promotor, alteran las interacciones histona-DNA y pueden:

1. Promover la movilidad del octámero de histona de modo que pueda deslizarse a lo largo del DNA a una nueva posición (fig. 12-47, trayectoria 1). En los casos mejor estudiados la unión de los activadores transcripcionales a los aumentadores corriente arriba del gen *IFN*-β conduce al desplazamiento de un nucleosoma clave alrededor de 35 pares de bases a lo largo del DNA, lo que expone la caja TATA que antes estaba cubierta por histonas. El deslizamiento ocurre a medida que el complejo de remodelación se transpone a lo largo del DNA.
2. Cambiar la conformación del nucleosoma. En el ejemplo que se ilustra en la figura 12-47, trayectoria 2, el DNA ha formado un asa o protuberancia transitoria en la superficie del octámero de histona, lo cual hace al sitio más accesible para la interacción con proteínas reguladoras de unión a DNA.
3. Facilitar el remplazo dentro del octámero de histona de un núcleo de histona estándar por una variante de histona (pág. 493) que se correlaciona con la transcripción activa. Por ejemplo, el complejo Swr1, que es un miembro de la familia SWI/SNF, intercambia dímeros H2A/H2B por dímeros H2AZ/H2B (figura 12-47, trayectoria 3).
4. Desplazar completamente del DNA el octámero de histona (fig. 12-47, trayectoria 4). No es claro si los complejos de remodelación de cromatina dependientes de ATP son capaces de tal proeza, pero otros complejos proteínicos (p. ej., FACT) que se mueven con la polimerasa de RNA pueden inducir esta reacción.

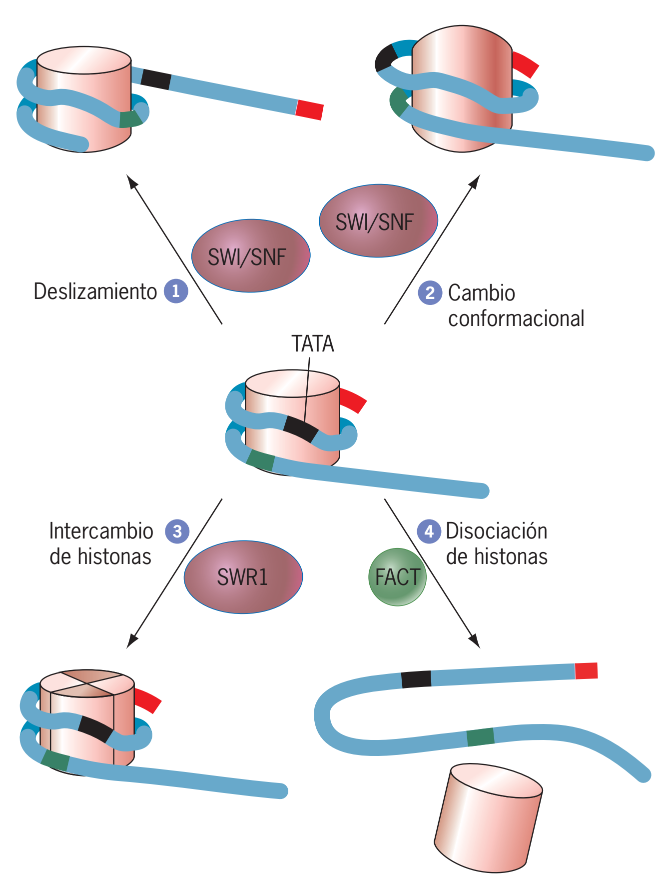


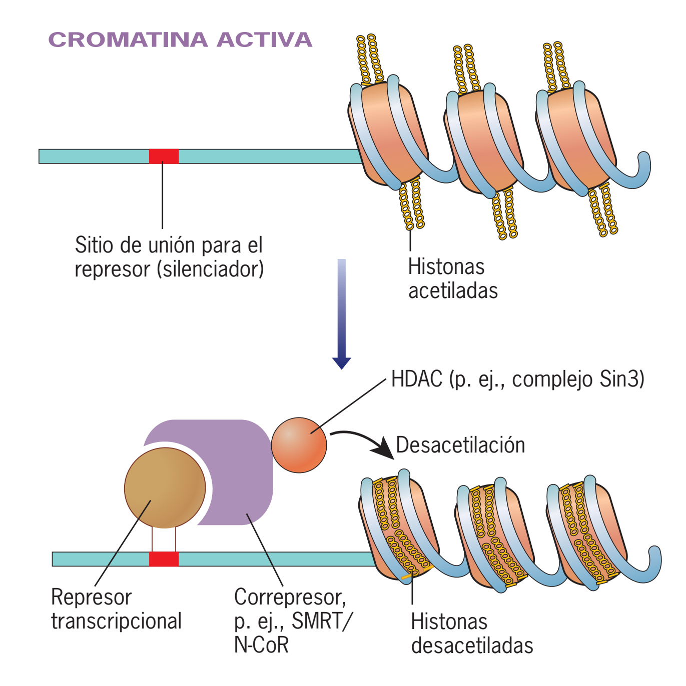
FIGURA 12-47 Varias acciones alternativas de los complejos de remodelación de cromatina. En la vía 1, se ha inducido a un nucleosoma clave a deslizarse a lo largo del DNA, lo cual expone el sitio de unión de la caja TATA, donde el complejo de preinicio puede ensamblarse. En la vía 2, el octámero de histona de un nucleosoma se ha reorganizado. Aunque la caja TATA no se encuentra por completo libre de su vinculación con histona, ahora es capaz de unirse a las proteínas del complejo de preinicio. En la vía 3, los dímeros H2A/H2B ordinarios de un nucleosoma se han intercambiado por dímeros H2AZ/H2B. En la vía 4, el octámero de histona se ha desensamblado y se ha perdido totalmente del DNA.

Represión de la transcripción

Como se deduce de las figuras 12-28 y 12-29, el control de la transcripción en células procariotas recae en especial sobre los represores, que son proteínas que se unen el DNA y bloquean la transcripción del gen cercano. Aunque los investigadores que estudian eucariotas se enfocan sobre todo en factores que activan o aumentan la transcripción de genes específicos, es evidente que las células eucariotas también poseen mecanismos de regulación negativa.[10]

Se sabe que la activación transcripcional se relaciona con cambios en el estado, la posición o ambos de los nucleosomas en una región particular de la cromatina. El estado de acetilación de la cromatina es una propiedad dinámica; así como existen enzimas (HAT) que agregan grupos acetilo, también las hay que los retiran. La remoción de grupos acetilo la efectúa la enzima **desacetilasa de histona** (**HDAC**). En tanto que las enzimas HAT se vinculan con la activación transcripcional, las enzimas HDAC se relacionan con la represión transcripcional. Las enzimas HDAC se presentan como subunidades de los grandes complejos descritos como *correpresores*. Los correpresores son similares a los coactivadores, excepto que son reclutados en loci genéticos específicos por factores transcripcionales (represores) que hacen que los genes blanco sean silenciados en vez de activados (fig. 12-48). Es posible que el avance de determinados

[10] En años recientes ha habido muchos indicios de que las moléculas de RNA no codificadoras también participan en varias vías distintas que conducen a la represión transcripcional. Es probable que esta área de investigación crezca mucho en el futuro cercano.



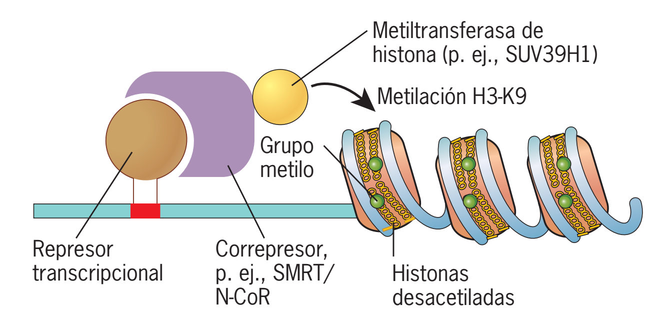


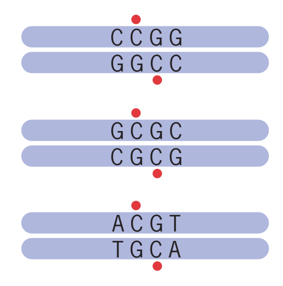
FIGURA 12-48 Un modelo de represión transcripcional. Las colas de histona de la cromatina activa se acetilan. Cuando un represor transcripcional se une a su sitio de unión de DNA, recluta un complejo correpresor (p. ej., SMRT/N-CoR) y una actividad relacionada con HDAC. La HDAC remueve los grupos acetilo de las colas de histona. Una proteína distinta (SUV39H1) que contiene actividad de metiltransferasa de histona agrega grupos metilo al residuo K9 de la cola de histona H3. La pérdida de grupos acetilo y la adición de grupos metilo en conjunto conducen a la inactivación de la cromatina y el silenciamiento génico.

tipos de cáncer dependa de la capacidad de las células tumorales de reprimir la actividad de determinados genes. En la actualidad se prueban varios fármacos anticancerosos que actúan inhibiendo enzimas HDAC específicas.

Estudios recientes indican que la remoción de grupos acetilo de las colas de histona se acompañan de otra modificación histónica: la metilación del residuo de lisina en la posición número 9 de las moléculas de histona H3. Debe recordarse que esta modificación, H3-meK9, se describió en la página 498 como un paso clave en la formación de la heterocromatina. Parece que esta misma modificación también participa en procesos de represión transcripcional mucho más dinámicos que ocurren dentro de las regiones de eucromatina del genoma. La figura 12-48 sugiere uno de los diferentes modelos posibles de represión transcripcional que incorporan algunos de estos aspectos de la modificación de la cromatina.

Aunque en la actualidad la represión transcripcional no se entiende muy bien, uno de los factores clave en la región de silenciamiento del genoma comprende un fenómeno que se conoce como metilación del DNA.

Metilación del DNA El análisis del DNA de los mamíferos y otros vertebrados indica que uno de cada 100 nucleótidos porta un grupo metilo añadido, que siempre se une al carbono 5 de una citosina. Los grupos metilo se agregan al DNA por medio de una familia de enzimas pequeñas denominadas *metiltransferasas de DNA* codificadas en humanos por genes *DNMT*. Se cree que esta simple modificación química sirve como una marca epigenética o "señal" que permite que ciertas regiones del DNA se identifiquen y utilicen de manera diferente de otras regiones. En mamíferos, los residuos de metilcitosina son parte del dinucleótido 5′-CpG-3′ dentro de una secuencia simétrica, como



en la cual los puntos rojos indican la posición de los grupos metilo. La mayoría de los residuos metilcitosina en el DNA se localizan dentro de secuencias repetidas no codificadoras, principalmente elementos transponibles (pág. 412). Se piensa que la metilación mantiene estos elementos en un estado inactivo.

Metilación de DNA y represión transcripcional La metilación del promotor de DNA se correlaciona con la represión de los genes. La mayoría de las evidencias sugiere que la metilación del DNA sirve más para mantener un gen en un estado inactivo que como un mecanismo inicial de inactivación. Como un ejemplo, la inactivación de genes en el cromosoma X de mamíferos hembras (pág. 497) ocurre antes de una onda de metilación del DNA que se piensa que convierte el DNA en un estado de represión permanente. El mantenimiento del estado reprimido es mediado por una clase de proteínas, incluida MeCP2, que se unen a los dinucleótidos CpG metilados. Según un modelo, estas proteínas se unen a sitios de metilación del DNA y entonces reclutan complejos correpresores con actividad de HDAC y SUV39H1 asociada. Como ya se dijo, estas enzimas actúan en histonas para eliminar grupos acetilo y metilar residuos H3K9, respectivamente, lo que en conjunto causa la compactación de la cromatina y la represión génica (como en la figura 12-48). Según este esquema, un tipo de modificación epigenética, la metilación del DNA, sirve como guía para orquestar un segundo tipo de modificación epigenética, la modificación de histona. A menudo los patrones de metilación anormal del DNA se relacionan con enfermedad. Por ejemplo, el desarrollo de tumores con frecuencia depende de la metilación aberrante y el posterior silenciamiento de genes cuya expresión normalmente suprimiría el crecimiento tumoral.

Aunque la metilación del DNA es una marca epigenética más o menos estable, no es irreversible. Los cambios más importantes en los niveles de metilación del DNA que tienen lugar durante la vida de un mamífero se muestran en la figura 12-49. El primer cambio importante en el nivel de metilación se observa entre la fertilización y el primer paso de la división del cigoto, cuando el DNA pierde las "marcas" de metilación que heredó de la generación previa. Luego, cerca del periodo en que el embrión se implanta en el útero, una onda de metilación nueva (o de novo) se disemina a través de las células y establece un nuevo patrón de metilación en todo el DNA. Aún se desconocen las señales que determinan si un gen en una célula determinada es blanco para la metilación o está libre en este periodo. No obstante, una vez que el patrón de metilación de DNA se establece dentro de una célula, al parecer se mantiene durante las divisio-

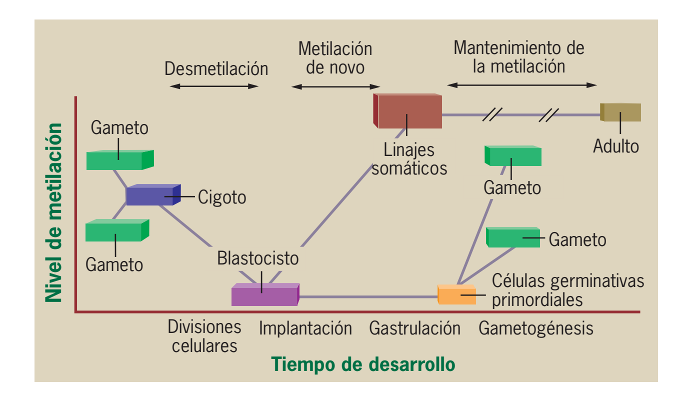


FIGURA 12-49 Cambios en los niveles de metilación de DNA durante el desarrollo de mamíferos. El DNA de un cigoto se encuentra sustancialmente metilado. El genoma sufre una desmetilación global durante la escisión. De manera interesante, el DNA heredado del padre se somete a desmetilación en un estadio temprano y por un mecanismo diferente al del heredado de la madre. Tras la implantación, el DNA experimenta nueva metilación (de novo) en las células que dan lugar al embrión, en tanto que el DNA de las células germinativas primordiales, que generan los gametos en el adulto, permanecen no metiladas. El DNA de las células germinales se metila en los estadios tardíos de la formación de los gametos. El nivel general de metilación se mantiene en las células somáticas (no germinales) a un nivel muy alto durante el resto del desarrollo y la edad adulta. (TOMADA DE R. JAENISCH, TRENDS GENET 13:325, 1997; DERECHOS RESERVADOS 1997, CON AUTORIZACIÓN DE ELSEVIER SCIENCE.)

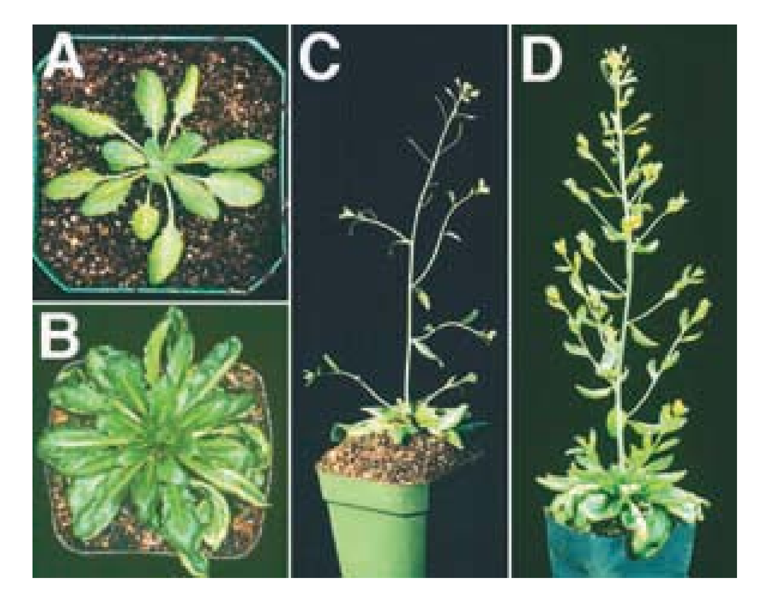


FIGURA 12-50 Demostración experimental de la importancia de la metilación del DNA en el desarrollo de las plantas. Planta de la especie *Arabidopsis thaliana* que se manipuló genéticamente para que porte un gen para un RNA antisentido que interfiere con la síntesis de una enzima que participa en la metilación del DNA (una metiltransferasa). La fotografía muestra los efectos de este tratamiento en una cepa cuyos niveles de metilación se redujeron 71%. Se ilustran plantas control en A y C, mientras que B y D corresponden a plantas tratadas con RNA antisentido. Una comparación de A y B muestra que las plantas tratadas producen muchas más hojas; la comparación de C y D muestra que las plantas tratadas producen cinco veces más tallos de flores. Además las flores de las plantas tratadas contienen muchos más estambres que los controles. (Reimpresa con autorización de Michael J. Ronemus et al., Science 273:655, 1996; cortesía de Stephen L. Dellaporta; © derechos reservados 1996, American Association for the Advancement of Science.)

nes celulares mediante una enzima (tal vez Dnmt1) que metila las cadenas de DNA hijas según el patrón de metilación de las cadenas parentales.

La metilación del DNA no es un mecanismo universal para inactivar los genes eucariotas. Por ejemplo, no se observa metilación del DNA ni en levaduras ni en nematodos. En cambio, a menudo el DNA de plantas experimenta muchísima metilación y los estudios en células de plantas cultivadas indican que, como en animales, la metilación del DNA se relaciona con la inactivación de genes. En un experimento, plantas tratadas con compuestos que interfieren con la metilación del DNA produjeron un número mucho mayor de hojas y capullos (fig. 12-50). Más aún, las flores de estos capullos tenían una morfología muy alterada.

Uno de los ejemplos más notables de la función de la metilación del DNA en el silenciamiento de la expresión génica ocurre como parte de un fenómeno epigenético conocido como huella genómica, que es exclusivo de los mamíferos.

Huella genómica Hasta mediados del decenio de 1980 se suponía que un grupo de cromosomas heredados del padre era equivalente en funciones al grupo correspondiente de cromosomas heredados de la madre. Pero, como otras deducciones muy generales, esta aseveración no pudo probarse. De hecho el que ciertos genes sean activos o inactivos durante el desarrollo temprano de mamíferos sólo depende de si fueron aportados al cigoto por el espermatozoide o por el oocito. Por ejemplo, el gen que codifica el factor de crecimiento fetal IGF2 sólo es activo en el cromosoma transmitido del padre. En cambio, el gen que codifica un canal de potasio específico (KVLQT1) sólo tiene actividad en el cromosoma heredado de la madre. Se dice que los genes de este tipo se derivan de la **huella** de acuerdo con su origen parental. La huella puede considerarse un fenómeno epigenético (pág. 506) a causa de las diferencias entre los alelos heredados de uno de los padres, pero no se basa en las diferencias de la secuencia del DNA. Se estima que el genoma de mamíferos contiene cuando menos 80 genes tipo huella localizados en diferentes grupos en los cromosomas.

Se piensa que los genes se convierten en huella como resultado de un proceso de metilación selectiva de uno de los dos alelos. Se observa por ejemplo que 1) las versiones materna o paterna de los genes que se convierten en huella difieren de manera importante en su grado de metilación y 2) los ratones que pierden la enzima clave de la metilación, la metiltransferasa (Dnmt1), son incapaces de mantener el estado de huella de los genes que heredan. Las ondas de metilación y remetilación del embrión temprano no afectan el estado de metilación de genes tipo huella (fig. 12-50). En consecuencia los mismos alelos que se inactivan a causa del proceso de huella en los huevos fertilizados serán inactivos en las células del feto y la mayoría de los tejidos adultos. La excepción principal ocurre en las células germinales, donde la herencia de la huella de los padres se borra durante el desarrollo temprano y después se restablece cuando cada individuo produce sus propios gametos. Deben existir algunos mecanismos por los que genes específicos (p. ej., *KVLQT1*) se marcan para inactivarse durante la formación de espermas, en tanto que otros genes (p. ej., *IGF2*) se marcan para inactivarse durante la formación del oocito. Los estudios recientes sugieren la participación de RNA no codificantes en el fenómeno de la huella.

Las alteraciones en los patrones de la huella se relacionan con diferentes anomalías genéticas humanas, en particular aquellas que comprenden un grupo de genes sometidos a huella que residen en el cromosoma 15. El síndrome de Prader-Willi es una alteración neurológica hereditaria que se caracteriza por retraso mental, obesidad y desarrollo gonadal deficiente. El trastorno aparece cuando el cromosoma 15 heredado del padre porta una deleción en una región pequeña que contiene los genes sometidos a huella. Como el cromosoma paterno porta una deleción de uno o más genes y el cromosoma materno tiene la versión inactiva del de éste con huella, los individuos carecen de copias funcionales del gen o los genes. Aunque los

genes suelen marcarse de por vida en un individuo, se conocen casos en los que se pierde la huella. De hecho, la pérdida de la huella del gen *IGF2* ocurre en alrededor de 10% de la población, lo cual da por resultado aumento en la producción del factor de crecimiento codificado. Los individuos con esta alteración epigenética están en riesgo mucho mayor de desarrollar cáncer colorrectal. Se descubrió el caso de una mujer que a causa de una supuesta deficiencia de una enzima DNA metilante produce oocitos que carecen por completo de genes sometidos a huella. Cuando se fertilizan, estos oocitos no se desarrollan más allá de la implantación, lo que demuestra la naturaleza esencial de esta contribución epigenética.

¿Qué posible función tiene la huella genómica en el desarrollo del embrión? Aunque existen diferentes propuestas para contestar esta pregunta, no hay una respuesta definitiva. Según un investigador, la huella genómica es "un fenómeno en busca de una razón" y aquí es donde esta obra abandona el tema.

REVISIÓN ?

1. ¿En qué aspectos son similares las funciones del represor bacteriano *lac* y el receptor de glucocorticoides de mamíferos? ¿En qué difieren?
2. ¿Qué tipos de secuencias reguladoras se encuentran en las regiones reguladoras del DNA corriente arriba de un gen como el que codifica para PEPCK? ¿Cuál es la función de estas secuencias en el control de la expresión de los genes cercanos?
3. ¿Qué significa el término "epigenético"? ¿Cómo es que tal diversidad de fenómenos, como la metilación del DNA, la metilación de histonas y la determinación del centrómero, pueden describirse como fenómenos epigenéticos?
4. ¿Cuáles son algunas de las propiedades que tienden a encontrarse en los diversos grupos de factores transcripcionales?
5. ¿Cuál es la diferencia entre activador transcripcional y represor transcripcional?, ¿entre coactivador y correpresor?, ¿entre HAT y HDAC?
6. ¿Cómo afecta la metilación del DNA la expresión génica? ¿Cómo se relaciona con la acetilación o la metilación de histona? ¿Qué significa huella genómica y cómo se relaciona con la metilación del DNA?

12.5 CONTROL A NIVEL DEL PROCESAMIENTO

El *splicing* alternativo regula la expresión génica a nivel del procesamiento de RNA y provee un mecanismo por el que un solo gen puede codificar dos o más proteínas relacionadas. Los genes de las plantas y los animales contienen numerosos intrones y exones (pág. 450). En el capítulo 11 se explicó cómo se eliminan los intrones de una transcripción primaria y cómo se retienen los exones, pero esto es apenas el inicio de la historia. En varios casos hay mucho más que una vía por la que una transcripción primaria puede procesarse. La vía de procesamiento

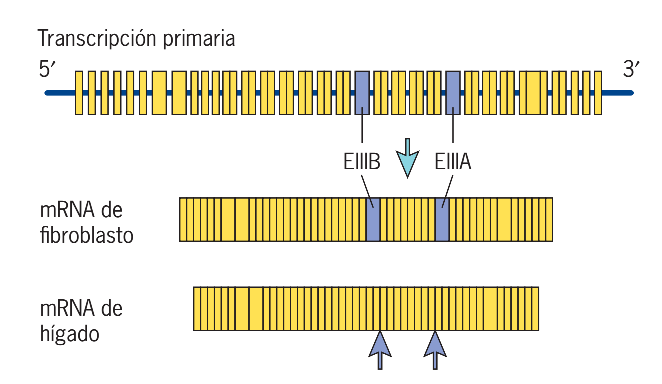


FIGURA 12-51 ***Splicing* alternativo del gen de la fibronectina.** El gen de la fibronectina consiste en diferentes exones que se muestran en la parte superior del dibujo (los intrones se presentan en negro y no están dibujados a escala). Dos de estos exones codifican para porciones del polipéptido llamadas EIIIA y EIIIB, que se incluyen en las proteínas producidas por los fibroblastos pero se excluyen en las proteínas que se sintetizan en el hígado. La diferencia se debe a *splicing* alternativo; estas porciones de pre-mRNA que codifican para esos dos exones se eliminan de la transcripción en las células hepáticas. Los sitios donde los exones se pierden se indican con una flecha en el mRNA hepático.

que se sigue puede depender del estadio del desarrollo o del tipo de célula o tejido a considerar. En el caso más simple, que es el único que se presentará, un segmento específico puede someterse a *splicing* y de ese modo eliminarse de la transcripción, o retenerse como parte del mRNA maduro, lo que depende del sistema de regulación que opera en la célula. Un ejemplo de este tipo de *splicing* alternativo tiene lugar durante la síntesis de la fibronectina, proteína que se encuentra tanto en el plasma sanguíneo como en la matriz extracelular (pág. 246). La fibronectina generada por fibroblastos y retenida en la matriz contiene dos péptidos más que la versión de la proteína que las células hepáticas sintetizan y se secreta a la sangre (fig. 12-51). Los péptidos adicionales son codificados por porciones del pre-mRNA que se retienen durante el procesamiento en los fibroblastos pero se remueven durante el procesamiento en la célula hepática.

En la mayoría de los casos las proteínas generadas por un gen particular mediante *splicing* alternativo son idénticas en casi toda su longitud pero difieren en regiones clave que pueden afectar propiedades importantes como su localización celular, los tipos de ligandos que unen o la cinética de su actividad catalítica. Diferentes factores transcripcionales se derivan de genes que pueden experimentar *splicing* alternativo, lo que genera variantes que pueden determinar la vía de diferenciación que la célula toma. En la mosca de la fruta, por ejemplo, la vía de desarrollo que lleva a un embrión a diferenciarse en hembra o en macho se determina por *splicing* alternativo de las transcripciones de ciertos genes.

El *splicing* alternativo puede ser muy complejo y ello permite una gran variedad de combinaciones de exones posibles en el producto final del mRNA. El mecanismo por el que un exón se incluye o excluye depende sobre todo de si la maquinaria de *splicing* selecciona los sitios específicos 3′ y 5′ como sitios de corte (pág. 453). Algunos sitios de *splicing* se describen como "frágiles", lo que indica que la maquinaria del *splicing* puede "saltarlos" bajo ciertas condiciones. El reconocimiento y el uso de

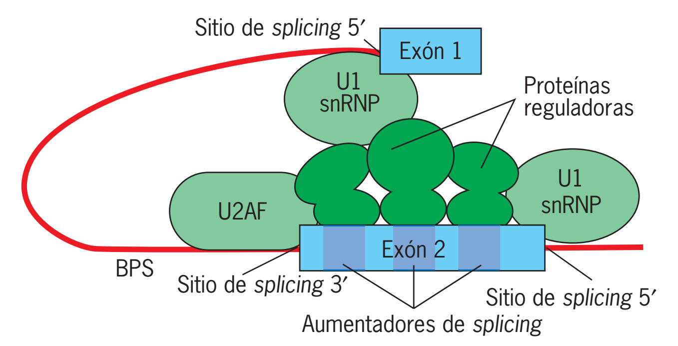


FIGURA 12-52 Un modelo de la función de los aumentadores exónicos de *splicing* en la regulación del *splicing* alternativo. En este caso el exón 2 contiene diferentes aumentadores de *splicing*, cada cerca de 6 a 8 nucleótidos, que unen proteínas reguladoras específicas (por lo general proteínas SR, p. 457). Estas proteínas reguladoras de unión reclutan factores de *splicing* clave (U2AF) y U1 snRNP a la vecindad de los sitios de *splicing* 3′ y 5′ respectivamente. [U2AF desempeña una función directa en el reclutamiento de U2 snRNP al sitio de ramificación (BPS), como se requiere para la formación del lazo.] Si U2AF y U1 snRNP no se reclutaran en los sitios de *splicing* a cada lado del exón 2, este exón no se reconocería y, en cambio, se eliminaría como parte del intrón. Los exones también pueden contener secuencias llamadas supresores de empalme exónicos (ESS, del inglés *exonic splicing suppressors*), que se unen a proteínas que bloquean el ensamblaje de espliceosomas y hacen que el exón quede fuera del mRNA maduro. (Tomada de K. J. Hertel et al., Curr. Opin. Cell Biol. 9:351, 1997.)

los sitios de *splicing* frágiles se controlan mediante secuencias en el RNA, aun los aumentadores exónicos de *splicing* (pág. 453), que se localizan dentro de los exones cuya inclusión está regulada. Los aumentadores exónicos de *splicing* sirven como sitio de unión para proteínas reguladoras específicas. Si una proteína reguladora se genera en una célula, esta proteína puede unirse al aumentador de *splicing* y reclutar los factores de *splicing* necesarios hacia un sitio de *splicing* frágil cercano 3′ o 5′. El empleo de estos sitios de *splicing* resulta en la inclusión del exón dentro del mRNA. La figura 12-52 describe un modelo de la forma en que este mecanismo puede trabajar. Si la proteína reguladora no se produce en la célula, los sitios de *splicing* vecinos no se reconocen y el exón se elimina junto con los intrones flanqueantes. Se identifican muchos otros mecanismos que regulan el *splicing* alternativo.

El procesamiento alternativo es difícil de estudiar porque requiere la preparación de mRNA de tamaño completo provenientes de distintos tejidos y estadios de desarrollo. Se estima que más de 60% de los genes humanos está sujeto a empalme alternativo. Además, hay incertidumbre acerca de cuántos mRNA distintos se producen a partir de la mayoría de las transcripciones, pero es probable que muchos de ellos se sometan a empalme alternativo para generar varios polipéptidos distintos. Para hacer esto aún más difícil de estudiar, las transcripciones homólogas con frecuencia se empalman de modo diferente en distintas especies. Por ejemplo, es probable que una razón importante de que ser humano y ratón sean tan diferentes, pese a que tienen genes similares, sea la diferencia en el modo en que se empalman muchas de sus transcripciones de genes homólogos.

El *splicing* alternativo tiene el *potencial* de generar gran número de polipéptidos relacionados a partir de un solo gen. Considérese un gen que contiene 10 exones que pueden experimentar *splicing* alternativo, esto es, exones que pueden incluirse o excluirse en el mRNA maduro. Un gen de este tipo tiene el potencial para generar decenas de miles de isoformas polipeptídicas distintas, mucho más que el número calculado de genes en el genoma humano entero. Se ha propuesto que este tipo de diversidad de proteínas tiene la importante función de dirigir la formación de sinapsis específicas. De hecho estudios recientes sugieren que ciertos genes que participan en la función neural pueden estar sujetos a *splicing* alternativo importante. Sin considerar si el *splicing* alternativo ocurre o no a gran escala, es evidente que el número de polipéptidos codificados por el genoma es por lo menos varias veces el número identificado mediante la secuenciación de DNA sola.

REVISIÓN

1. ¿De qué manera el *splicing* alternativo puede incrementar el número de genes en el genoma?
2. Describa un ejemplo de *splicing* alternativo. ¿Cuál es el valor de este tipo de control para una célula? ¿Cómo podría una célula regular los sitios en el pre-mRNA que se seleccionan para *splicing*?

12.6 CONTROL A NIVEL TRADUCCIONAL

El control a nivel traduccional comprende una amplia variedad de mecanismos reguladores que afectan la traducción del mRNA transportado con anterioridad desde el núcleo hasta el citoplasma. Los factores considerados bajo este rubro regulador general incluyen 1) la localización del mRNA en ciertos sitios dentro de la célula; 2) si un mRNA se traduce o no y con qué frecuencia, y 3) la vida media del mRNA, una propiedad que determina cuántas veces se traduce el mensaje.

Los mecanismos de control a nivel traduccional suelen operar por medio de interacciones entre mRNA específicos y varias proteínas presentes dentro del citoplasma. En la página 447 se destacó que los mRNA contenían segmentos no codificantes conocidos como **regiones no traducidas (UTR)**, en sus extremos 5′ y 3′. La 5′ UTR se extiende desde la caperuza metil-guanosina al inicio del mensaje hasta el codón de iniciación AUG, en tanto que 3′ UTR se extiende desde el codón de terminación en el extremo de la región codificante hasta el final de la cola de poli(A) que se encuentra unida en casi todos los mRNA de los organismos eucariotas (véase fig. 11-21). Aunque por muchos años las secciones no traducidas del mensaje se ignoraron, se descubrió que las regiones UTR contienen secuencias nucleotídicas que la célula utiliza para mediar el control a nivel traduccional. En las secciones siguientes se consideran tres aspectos distintos del control a nivel traduccional: la localización, la traducción y la estabilidad del mRNA.

Localización citoplásmica de los mRNA

La información necesaria para que un oocito fertilizado inicie la formación de un embrión se localiza dentro del oocito durante la oogénesis. A continuación se estudia en forma breve

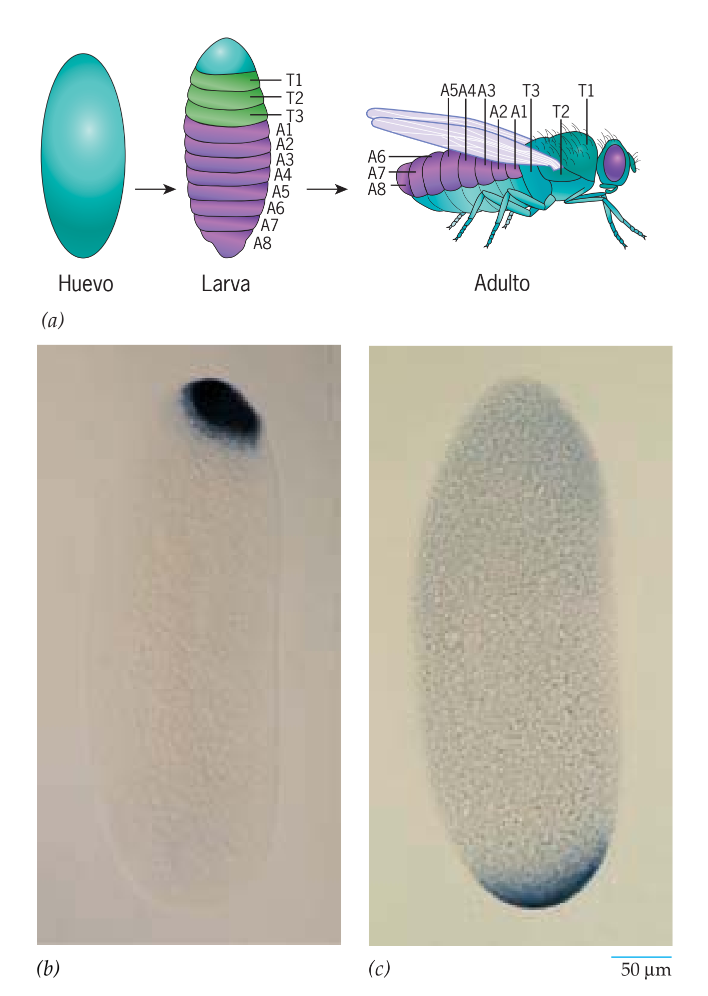
la mosca de la fruta, cuyos oocitos, larvas y estadios adultos se ilustran en la figura 12-53*a*. El desarrollo del eje anteroposterior (cabeza-abdomen) de una larva de mosca y del subsecuente adulto es anticipado por la localización de mRNA a lo largo del mismo eje en el oocito. Por ejemplo, las transcripciones de mRNA del gen *bicoid* se localizan de manera preferencial en el extremo anterior del oocito, mientras que los mRNA transcritos del gen *oskar* se ubican en el extremo opuesto (fig. 12-53*b*, *c*). Los mRNA se traducen después en el sitio de localización. Las proteínas que el mRNA de *bicoid* codifica tienen una función crucial en el desarrollo de la cabeza y el tórax, en tanto que la proteína que el mRNA de *oskar* codifica se requiere para la formación de las células germinales, que se desarrollan en la parte posterior de la larva.

La información que regula la localización citoplásmica de un mRNA reside en la 3′ UTR. Lo anterior puede demostrarse al utilizar moscas de la fruta que portan un gen extranjero cuya región codificante se acopla a una secuencia de DNA que codifica para la 3′ UTR de los mRNA de *bicoid* u *oskar.* Cuando un gen extranjero se transcribe durante la oogénesis, el mRNA puede localizarse en un sitio que 3′ UTR determina. La localización de los mRNA está mediada por proteínas específicas que reconocen las secuencias de localización (llamados *códigos zip*) en esa región del mRNA.

Los microtúbulos, y las proteínas motoras que los utilizan como vehículos, desempeñan una función importante en el transporte del mRNA hacia localizaciones específicas. Por ejemplo, la localización de los mRNA de *oskar* en un oocito de mosca de la fruta puede alterarse con fármacos como la colquicina que despolimerizan los microtúbulos y mediante mutaciones que alteran la actividad de la proteína motora cinesina I. Por otra parte, se piensa que los microfilamentos anclan los mRNA después que éstos llegan a su destino final. La localización del mRNA no se restringe a los huevos y oocitos, también se encuentra en todos los tipos de células polarizadas. Por ejemplo, se observa que los mRNA de actina se localizan cerca del extremo de avance del fibroblasto en migración, que es el sitio donde las moléculas de actina son necesarias para la locomoción (fig. 12-53*d*). Durante el proceso de localización, la traducción de los mRNA es inhibida de manera específica por proteínas relacionadas, lo cual hace surgir el tema del control de la traducción.

El control de la traducción del mRNA

Los mRNA almacenados en un huevo no fertilizado son moldes para la síntesis de proteínas durante los estadios tempranos del desarrollo; no se utilizan para la síntesis de proteínas en el huevo mismo. Considérese el caso de un huevo de erizo de mar no fertilizado. Si una suspensión de estos huevos se incuba con aminoácidos marcados con radiactividad, muy poca de esta radiactividad se incorpora en la proteína (fig. 12-54*a*, línea azul). Sin embargo, si la misma preparación de huevo se fertiliza mediante la adición de esperma, la incorporación de aminoácidos marcados aumenta de manera importante (fig. 12-54*a*, línea



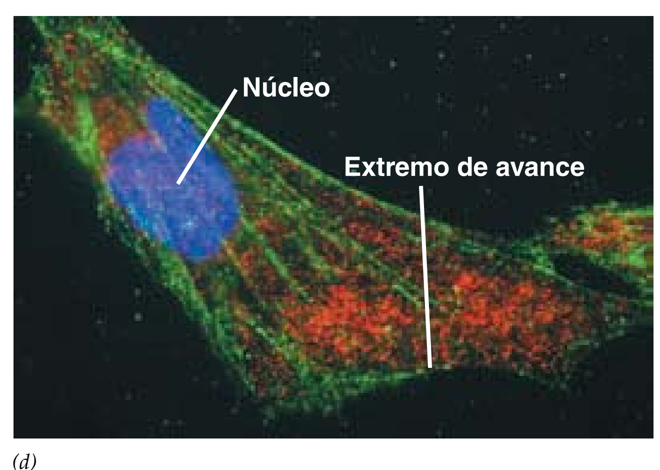
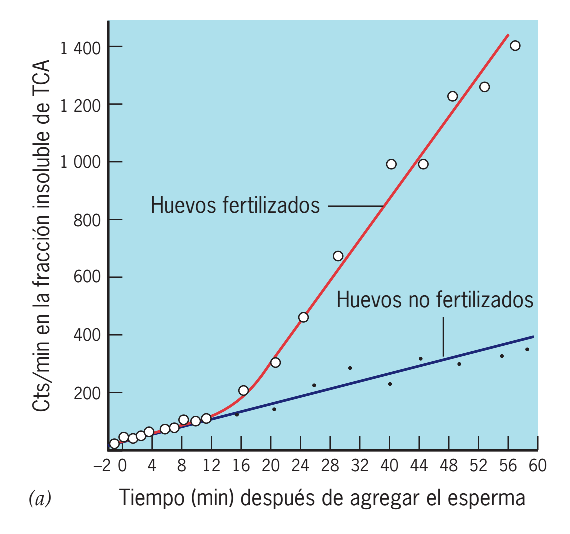
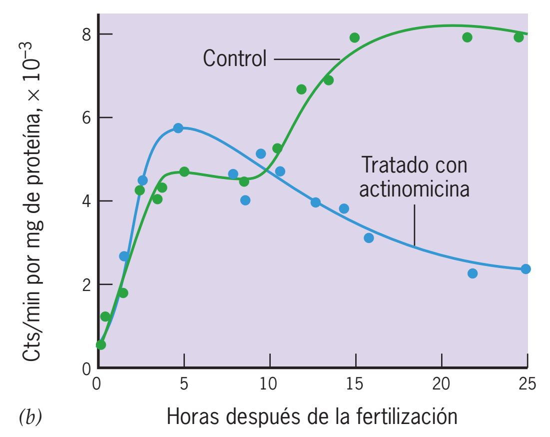


FIGURA 12-53 Localización citoplásmica de los mRNA. *a*) Esquema que ilustra los tres estadios de la vida de la mosca de la fruta: el huevecillo, la larva y el adulto. Se muestran los segmentos del tórax y el abdomen. *b*) Localización del mRNA de *bicoid* en el polo anterior de un estadio temprano de segmentación mediante hibridación in situ. *c*) Localización del mRNA de *oskar* en el polo posterior en un estadio comparable al que se muestra en *b*. En ambos la localización de los RNA desempeña una función importante en el desarrollo el eje anteroposterior de la mosca de la fruta. *d*) Localización del mRNA (rojo) cercano a los extremos de migración de los fibroblastos. Ésta es la región celular donde se utiliza la actina durante la locomoción (véase fig. 9-71). (*B*, cortesía de Daniel St Johnston; *C*, cortesía de Antoine Guichet y Anne Ephrussi; *D*, tomada de V. M. Latham, et al., cortesía de Robert H. Singer, Curr Biol 11:1010, 2001.)





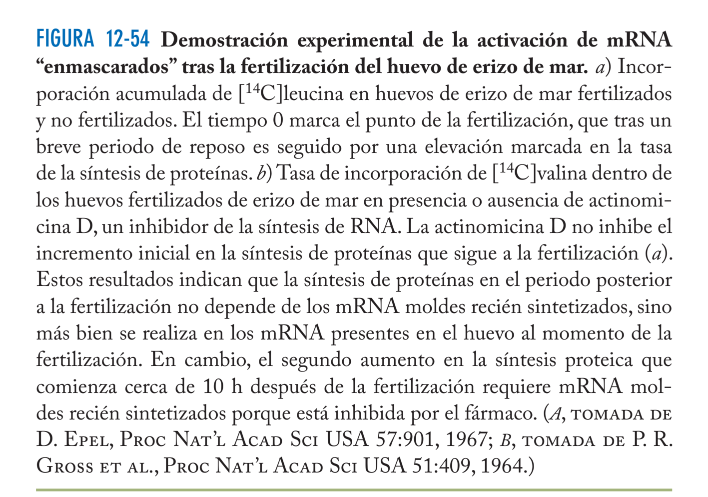
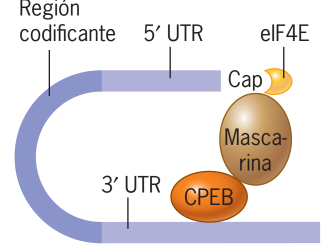
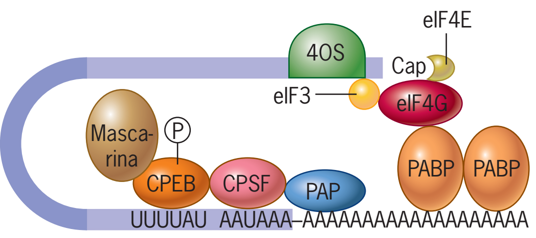


FIGURA 12-54 Demostración experimental de la activación de mRNA "enmascarados" tras la fertilización del huevo de erizo de mar. *a*) Incorporación acumulada de [^{14}C]leucina en huevos de erizo de mar fertilizados y no fertilizados. El tiempo 0 marca el punto de la fertilización, que tras un breve periodo de reposo es seguido por una elevación marcada en la tasa de la síntesis de proteínas. *b*) Tasa de incorporación de [^{14}C]valina dentro de los huevos fertilizados de erizo de mar en presencia o ausencia de actinomicina D, un inhibidor de la síntesis de RNA. La actinomicina D no inhibe el incremento inicial en la síntesis de proteínas que sigue a la fertilización (*a*). Estos resultados indican que la síntesis de proteínas en el periodo posterior a la fertilización no depende de los mRNA moldes recién sintetizados, sino más bien se realiza en los mRNA presentes en el huevo al momento de la fertilización. En cambio, el segundo aumento en la síntesis proteica que comienza cerca de 10 h después de la fertilización requiere mRNA moldes recién sintetizados porque está inhibida por el fármaco. (*A*, TOMADA DE D. EPEL, PROC NAT'L ACAD SCI USA 57:901, 1967; *B*, TOMADA DE P. R. GROSS ET AL., PROC NAT'L ACAD SCI USA 51:409, 1964.)

roja). La tasa de síntesis de proteínas aumenta con lentitud en las siguientes horas y los niveles decaen conforme el embrión se desarrolla en una blástula de mil o más células (fig. 12-54*b*). Si los huevos de erizo de mar se fertilizan e incuban en presencia de actinomicina D (un potente inhibidor de la síntesis de mRNA), la activación de la síntesis de proteína después de la fertilización ocurre al mismo grado que en los cultivos control (fig. 12-54*b*). Como no pueden producirse nuevos mRNA en presencia de este fármaco, las proteínas deben sintetizarse a partir de los mRNA preexistentes que se activan después de la fertilización. El inicio de la traducción de estos mRNA almacenados comprende por lo menos dos fenómenos distintos: la inactivación de las proteínas inhibidoras de unión y un incremento en la longitud de las colas de poli(A) por la acción de una enzima que se encuentra en el citoplasma de los huevos. Estos fenómenos se ilustran en el modelo de activación traduccional de la figura 12-55.

Se descubrieron diferentes mecanismos que regulan la tasa de traducción del mRNA en respuesta a los requerimientos celulares cambiantes. Puede considerarse que algunos de estos mecanismos actúan de manera *global* porque afectan la traducción de todos los mensajes. Cuando una célula humana está sujeta a ciertos estímulos estresantes, se activa una proteína cinasa que fosforila el factor de iniciación eIF2, el cual bloquea la síntesis posterior de proteínas. Como se explica en la página 471, el factor eIF2-GTP libera el tRNA iniciador de la subunidad ribosómica pequeña, tras lo cual se convierte en eIF2-GDP y se libera. La versión fosforilada del factor eIF2 no puede intercambiar su GDP por GTP, que se requiere para que el eIF2 se comprometa en otro ciclo de inicio de la traducción. Es interesante notar que se identifican cuatro proteínas cinasas distintas que tienen la capacidad de fosforilar el mismo residuo de serina de la subunidad eIF2α para activar la inhibición traduccional. Cada una de estas cinasas se activa después de un tipo de estrés celular dife-





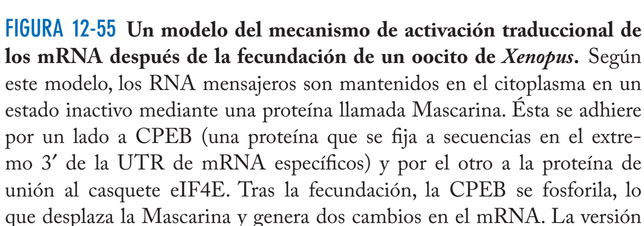


FIGURA 12-55 Un modelo del mecanismo de activación traduccional de los mRNA después de la fecundación de un oocito de *Xenopus*. Según este modelo, los RNA mensajeros son mantenidos en el citoplasma en un estado inactivo mediante una proteína llamada Mascarina. Ésta se adhiere por un lado a CPEB (una proteína que se fija a secuencias en el extremo 3′ de la UTR de mRNA específicos) y por el otro a la proteína de unión al casquete eIF4E. Tras la fecundación, la CPEB se fosforila, lo que desplaza la Mascarina y genera dos cambios en el mRNA. La versión fosforilada de CPEB recluta otra proteína CPSF, que a su vez recluta polimerasa de poli(A) (PAP), una enzima que agrega residuos adenosina a la cola de poli(A). La fosforilación de CPEB también causa la disociación de Mascarina del eIF4E y el reclutamiento de eIF4G, un factor de inicio necesario para la traducción. Como resultado de estos cambios, el mRNA puede traducirse. (REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE R. D. MENDEZ & J. D. RICHTER, NATURE REVIEWS MOL. CELL BIOL. 2:524, 2001, © COPYRIGHT 2001 POR MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.) Cap, caperuza.

rente, inclusive el golpe de calor, la infección vírica, la presencia de proteínas sin plegamiento adecuado o la falta de aminoácidos en el medio de cultivo. Por lo menos cuatro vías diferentes del estrés convergen para inducir la misma respuesta.

Otros mecanismos influyen en el ritmo de traducción de mRNA *específicos* a través de la acción de proteínas que reconocen elementos específicos en las UTR de esos mRNA. Uno de los ejemplos mejor estudiados comprende el mRNA que codifica para la proteína ferritina. La proteína ferritina secuestra átomos de hierro en el citoplasma celular y de esta forma protege las células de los efectos tóxicos del metal libre. La traducción del mRNA de ferritina está regulada por un represor específico, que se conoce como *proteína reguladora de hierro* (*IRP*), cuya actividad depende de la concentración de hierro libre en la célula. A bajas concentraciones de hierro, IRP se une a una secuencia específica de la 5′ UTR del mensaje llamada *elemento de respuesta al hierro* (*IRE*) (fig. 12-56). La unión de IRP interfiere con el acceso de un ribosoma al extremo 5′ del mensaje y por tanto el inicio de la traducción se inhibe. Sin embargo, en presencia de concentraciones altas de hierro, la IRP se modifica de modo que pierde su afinidad por las secuencias IRE. La disociación de IRP del mRNA de ferritina permite el acceso de la maquinaria traduccional al mRNA codificante y la proteína codificada se sintetiza.

Las proteínas no son sólo moléculas que pueden actuar como reguladores traduccionales. Como se señaló en la página 462, los microRNA (miRNA) originalmente se descubrieron como inhibidores de la traducción de mRNA específicos en nematodos. Ahora se conocen cientos de miRNA en animales y plantas superiores, y su función como reguladores traduccionales tiene mayor importancia.

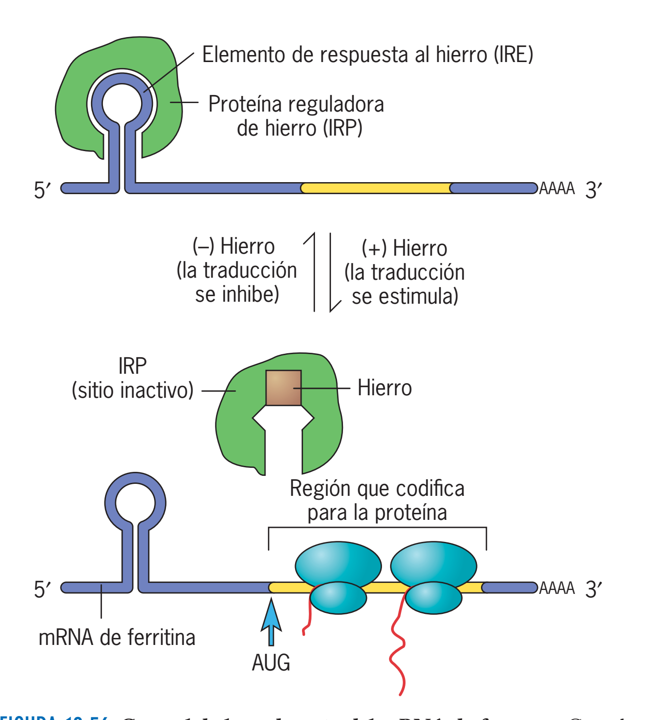
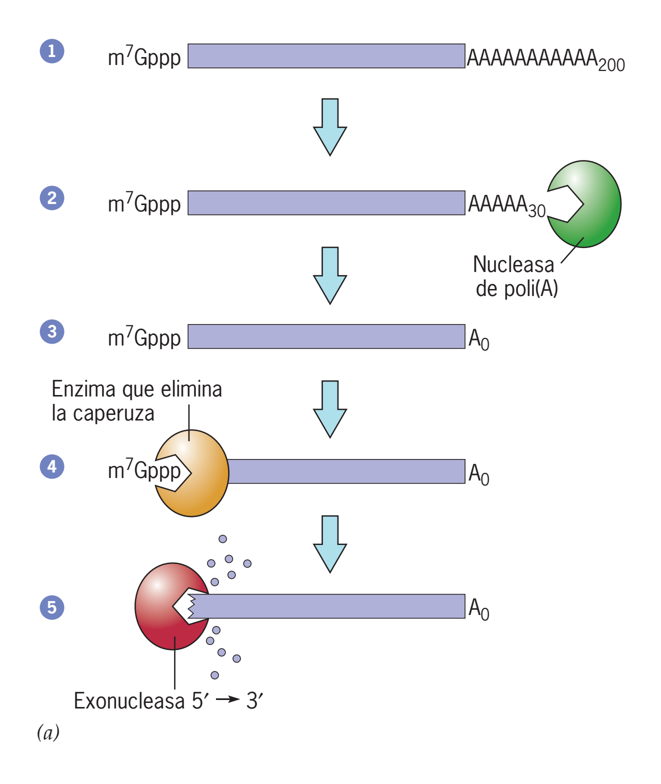


FIGURA 12-56 Control de la traducción del mRNA de ferritina. Cuando las concentraciones de hierro son bajas, una proteína represora que une hierro, llamada proteína reguladora de hierro (IRP), se une a una secuencia específica de la 5′ UTR del mRNA de ferritina, denominada elemento de respuesta al hierro (IRE), que se pliega en un asa. Cuando el hierro está disponible, se une a la IRP, cambia su conformación y ocasiona que se disocie del IRE, lo que permite la traducción del mRNA para formar ferritina. La evidencia sugiere que el hierro unido está presente como sulfato de hierro (pág. 192).

El control de la estabilidad del mRNA

El tiempo que dura un mRNA en una célula, la mayoría de las veces, es para la síntesis de un polipéptido. Si una célula controla la expresión de genes, es importante que regule la supervivencia del mRNA, así como en primer lugar también se regula la síntesis de este mRNA. A diferencia de un mRNA procariota, que comienza a degradarse en su extremo 5′ antes que su extremo 3′ esté completo, la mayoría de los mRNA eucariotas tiene una vida media hasta cierto punto larga. No obstante, la vida media de los mRNA eucariotas es muy variable. Por ejemplo, el mRNA de *FOS*, que participa en el control de la división celular, se degrada con rapidez en la célula (vida media de 10 a 30 min). Como resultado Fos sólo se produce por un periodo corto. En cambio, el mRNA que codifica para la producción de proteínas dominantes de una célula particular, como la hemoglobina en un eritrocito precursor o la ovoalbúmina en una célula de oviducto de gallina, casi siempre tiene una vida media de más de 24 h. Por tanto, como sucede con la localización del mRNA o la tasa de inicio de la traducción del mismo, la maquinaria reguladora de la célula puede reconocer mRNA específicos y darles un tratamiento diferente.

Experimentos tempranos mostraron que el mRNA carente de colas de poli(A) se degradó con rapidez tras inyectarse en células, mientras que el mismo mRNA con colas de poli(A) fue estable. Ésta fue la primera pieza de evidencia que sugirió que la longevidad de un mRNA se relaciona con la longitud de su cola de poli(A). Cuando un mRNA típico abandona el núcleo, contiene una cola de cerca de 200 residuos de adenosina (fig. 12-57*a*, paso 1). Cuando un mRNA permanece en el citoplasma, la longitud de su cola de poli(A) tiende a reducirse en forma gradual conforme aquél se degrada por efecto de la ribonucleasa de poli(A). No se observan efectos en la estabilidad del mRNA hasta que la cola se reduce a alrededor de 30 residuos (paso 2). Una vez que la cola se acorta a esta longitud, el mRNA suele degradarse con rapidez por otras dos vías. En una de estas vías (que se muestra en la figura 12-57*a*) la degradación del mRNA comienza en su extremo 5′ seguida de la remoción de la cola de poli(A) en el extremo 3′ del mensajero. El hecho de que la cola de poli(A) en el extremo 3′ del mensajero proteja la caperuza del extremo 5′ de la molécula sugiere que los dos extremos del mRNA se mantienen en proximidad cercana (véase fig. 11-47). Una vez que la cola que se encuentra en la región 3′ se elimina (paso 3, fig. 12-57*a*), se elimina la caperuza del mensaje (paso 4) y se degrada desde el extremo 5′ hacia el extremo 3′ (paso 5). Tanto la eliminación del capuchón como la degradación 5′ → 3′ ocurren dentro de pequeñas estructuras citoplásmicas llamadas *cuerpos P*, que podrían tener una función general en el almacenamiento y la destrucción de mRNA que ya no se traducen. En la vía alterna de degradación del mRNA que se muestra en la figura 12-57*b*, la deleción de la cola de poli(A) (paso 3a) es seguida por la digestión continua del mRNA desde su extremo 3′ (paso 4a). La digestión de los mRNA en dirección 3′ → 5′ la efectúa



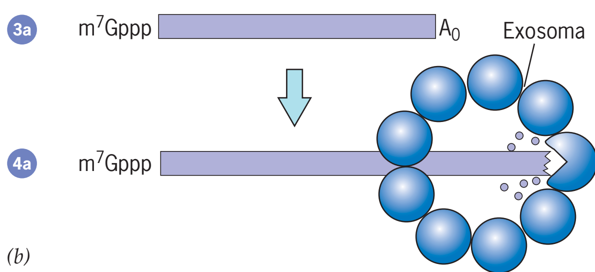


FIGURA 12-57 Degradación de mRNA en células de mamífero. Los pasos mostrados en el dibujo se describen en el texto.

una exonucleasa que es parte de un complejo de exonucleasas conocido como *exosoma*.

Debe haber más mecanismos que participan en la longevidad del mRNA que la simple longitud de su cola de poli(A), puesto que los mRNA tienen vidas medias muy diferentes con colas de poli(A) de tamaño similar. Una vez más las diferencias en la secuencia nucleotídica de 3′ UTR tienen una función importante en la tasa a la que la cola de poli(A) se acorta. Por ejemplo, la 3′ UTR del mRNA de globina contiene diferentes repeticiones de CCUCC que sirven como sitios de unión para proteínas específicas que estabilizan el mensaje. Si estas secuencias se mutan, el mRNA se desestabiliza. En cambio los mRNA de vida corta a menudo contienen elementos ricos en AU (p. ej., repeticiones AUUUA) en 3′ UTR que al parecer se unen a las proteínas que desestabilizan el mensaje. Si una de estas secuencias desestabilizantes se introduce en la 3′ UTR del gen de globina, la estabilidad del mRNA transcrito del gen modificado se reduce de una vida media de 10 h a una vida media de 90 min. La importancia de estas secuencias desestabilizantes (y el promedio de inestabilidad del mRNA que producen) puede apreciarse al considerar la vida corta del mRNA de *FOS* que se mencionó antes. Si la secuencia desestabilizante del gen *FOS* se pierde por una deleción, la vida media del mRNA de *FOS* se incrementa y las células suelen tornarse malignas. Se piensa que las secuencias desestabilizantes en 3′ de la UTR sirven como sitios de unión para proteínas (p. ej., AUF1) y para RNA no codificadores (p. ej., miR-430) que inducen la desadenilación y la ulterior destrucción del mRNA. Por ejemplo, al parecer los microRNA tienen un cometido importante en la destrucción final por el embrión de los mRNA maternos que se almacenan en el óvulo al momento de la fecundación (pág. 534).

Antes de abandonar los aspectos del control a nivel traduccional y el control de la expresión génica en general debe notarse que la expresión génica puede controlarse mediante otras actividades que no se esperaban antes de su descubrimiento. Hasta ahora, tales actividades se han detectado sólo en unos cuantos sistemas y su aplicabilidad funcional permanece indefinida. Estas actividades incluyen:

- Cambio de marco traduccional, en el que el ribosoma cambia de marco de lectura en algún punto durante su jornada a lo largo del mRNA al moverse un nucleótido hacia adelante o hacia atrás. El cambio de marco puede deberse al desplazamiento de un tRNA de un codón a un triplete traslapado, que luego se convierte en el nuevo codón. Puesto que el cambio del marco de lectura puede ocurrir con una eficiencia menor de 100%, es posible que se generen dos polipéptidos distintos a partir del mismo mRNA.
- Lectura a través del codón de terminación, en la que el ribosoma continúa después del codón de terminación.
- Edición de RNA mensajero, en la que nucleótidos específicos se convierten en otros nucleótidos después que el RNA se transcribe (p. ej., postranscripcionalmente). La edición de RNA puede crear nuevos sitios de *splicing*, generar codones de paro u ocasionar sustituciones de aminoácidos. La edición de mRNA tiene particular importancia en el sistema nervioso, donde un gran número de mensajes parecen tener una o más adeninas (A) convertidas en inosinas (I). Esta modificación comprende la deleción enzimática de un grupo amino del nucleótido. El receptor de glutamato, que media la transmisión sináptica excitadora en el cerebro (pág. 169), es producto de la edición de RNA. En este caso una modificación de una A en una I genera un receptor de glutamato cuyo canal interno es permeable a los iones de Ca^{2+}. Los ratones genéticamente manipulados que son incapaces de llevar a cabo este proceso específico de edición del RNA experimentan ataques epilépticos graves y mueren en pocas semanas después del nacimiento.
- Iniciación de traducción alternativa, en la que diferentes codones de AUG en el mismo mRNA se utilizan como codón de inicio en la síntesis de polipéptidos (véase nota al pie de la página 522).
- Salto traduccional, en el que el ribosoma "salta" sobre una secuencia de nucleótidos en un mRNA específico y deja una porción interna del mensaje sin traducir.
- *Splicing* de proteína, en el que un segmento de un polipéptido específico se elimina y los dos extremos se unen de manera covalente.

REVISIÓN ?

1. Describa tres diferentes vías por las que la expresión génica puede controlarse a nivel traduccional. Citar un ejemplo de cada uno de estos mecanismos de control.
2. ¿Cuál es la función del poli(A) en la estabilidad del mRNA? ¿Cómo regula la célula la estabilidad de diferentes mRNA?
3. Describa los diferentes niveles a los que la expresión génica se regula para permitir que un gen de globina beta con la siguiente estructura dirija la formación de una proteína que representa más de 95% de la proteína celular.

   exón 1—intrón—exón 2—intrón— exón 3

12.7 CONTROL POSTRADUCCIONAL: DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA

Las células poseen mecanismos complejos para controlar la tasa a la que las proteínas se sintetizan. No resulta inesperado que las células posean mecanismos para controlar el periodo que las proteínas sobreviven una vez que son por completo funcionales. Aunque el tema de la estabilidad proteica no cae técnicamente bajo el encabezado del control de la expresión génica, es una extensión lógica de este tópico y por tanto se trata en esta parte del texto. Los estudios pioneros en el área de degradación selectiva de proteínas los efectuaron Avram Hershko y Aaron Ciechanover en Israel e Irwin Rose y Alexander Varshavsky en Estados Unidos.

La degradación de proteínas celulares se realiza en máquinas cilíndricas que degradan proteínas llamadas **proteosomas** que se encuentran tanto en el núcleo como en el citosol de las células. Los proteosomas consisten en cuatro anillos de subunidades polipeptídicas apilados uno sobre otro con una cubierta unida a cada extremo de la pila (fig. 12-58*a*, *b*). Los dos anillos centrales consisten en polipéptidos (subunidades beta) que funcionan como enzimas proteolíticas. Los sitios activos de estas subunidades se dirigen a la cámara central cubierta, donde la digestión proteolítica ocurre en un ambiente protegido.

Los proteosomas digieren proteínas seleccionadas y marcadas para su destrucción como se describe más adelante. Algunas proteínas se seleccionan porque se reconocen como anormales, ya sea por un plegamiento anormal o por vinculación incorrecta con otras proteínas. Este grupo incluye las proteínas anormales que se produjeron en los ribosomas unidos a la membrana de retículo endoplásmico rugoso (pág. 292). La selección de proteínas "normales" para la destrucción mediante proteosoma se basa

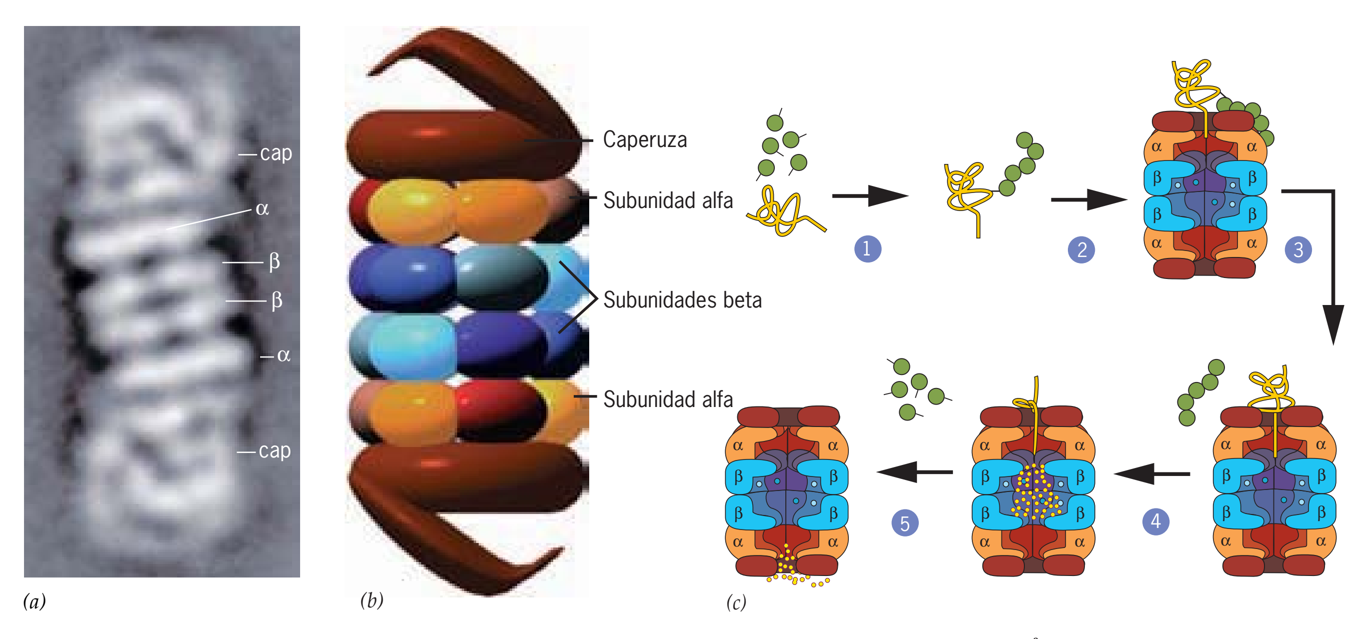


FIGURA 12-58 **Estructura y función del proteosoma.** *a*) Micrografía electrónica de alta resolución de un proteosoma aislado de *Drosophila*. *b*) Modelo de un proteosoma basado en microscopia electrónica de alta resolución y cristalografía de rayos X. Cada proteosoma consiste en dos grandes caperuzas en el extremo de un núcleo en forma de túnel que está formado por cuatro anillos apilados. Cada anillo consta de siete subunidades que se dividen en dos clases: tipo alfa y tipo beta. Los dos anillos internos se componen de subunidades beta, que rodean una cámara central. Las subunidades se dibujaron en colores diferentes porque son polipéptidos similares pero no idénticos. Tres de las siete subunidades beta de cada anillo tienen actividad proteolítica, las otras cuatro son inactivas en células eucariotas. (Las células procariotas también poseen proteosomas, pero tienen una estructura más simple, y todas las subunidades beta son activas.) Los dos anillos externos se componen de subunidades alfa sin actividad enzimática que forman una abertura estrecha (de alrededor de 13 Å) a través de la cual los polipéptidos sustrato no plegados se introducen para llegar a la cámara central, donde se degradan. *c*) Pasos de la degradación de las proteínas por medio del proteosoma. En el paso 1 la proteína que se degradará se une de manera covalente a un grupo de moléculas de ubiquitina. La unión de las ubiquitinas requiere la participación de tres enzimas distintas (E1, E2 y E3) en un proceso que no se explica en el texto. En el paso 2 la proteína poliubiquitinada se une a la caperuza del proteosoma. La cadena de ubiquitina se elimina y el polipéptido no plegado penetra en la cámara central del proteosoma (paso 3), donde se degrada por efecto de la actividad catalítica de las subunidades beta (pasos 4 y 5). (*A*, CORTESÍA DE H. HÖLZL Y WOLFGANG BAUMEISTER, J CELL BIOL. 150:126, 2000; MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

en la estabilidad biológica de la proteína. Se piensa que cada proteína tiene una longevidad característica. Algunas moléculas proteicas, como las enzimas de la glucólisis o las moléculas de globina de un eritrocito, están presentes por días a semanas. Otras proteínas que se requieren para actividades fugaces específicas, como las proteínas que regulan el inicio de la replicación del DNA o que activan la división celular, pueden sobrevivir sólo unos pocos minutos. La destrucción de tales proteínas reguladoras clave por proteosomas tiene un cometido crucial en el avance de los procesos celulares (como se ilustra en la figura 14-26). La importancia de los proteosomas en los procesos de vida y muerte de la célula puede demostrarse mediante el uso de fármacos que inhiben de manera específica la digestión proteosómica.

Los factores que controlan el tiempo de vida de una proteína no se comprenden bien. Uno de los determinantes es la secuencia de aminoácidos específicos que reside en el extremo aminoterminal de una cadena polipeptídica. Los polipéptidos que terminan en arginina o lisina, por ejemplo, por lo general tienen una vida corta. Diferentes proteínas que actúan en periodos específicos del ciclo celular se marcan para su destrucción cuando ciertos residuos se fosforilan. Otras proteínas portan una secuencia interna específica de aminoácidos llamada *degrón* que asegura que no sobrevivan mucho tiempo dentro de la célula.

La **ubiquitina** es una proteína pequeña altamente conservada con varias funciones en diversos procesos celulares. Por ejemplo, en la página 314 se señaló que las proteínas de membrana que portan una sola molécula de ubiquitina adherida se incorporan de manera selectiva en vesículas endocíticas. Por tanto, la unión de una sola molécula de ubiquitina funciona de manera primaria como una señal de direccionamiento. En cambio, las proteínas se marcan para su destrucción mediante la unión de diferentes moléculas de ubiquitina y forman una cadena de poliubiquitina (paso 1, fig. 12-58*c*). En la primera parte de este proceso la ubiquitina se transfiere por una reacción enzimática a los residuos de lisina en la proteína marcada. Las enzimas que transfieren la ubiquitina a las proteínas blanco comprenden una gran familia de *ligasas de ubiquitina* en las que diferentes miembros reconocen proteínas que portan diversas señales de degradación. Estas enzimas desempeñan una función crucial en la determinación de la vida o la muerte de proteínas clave y son tema de la investigación actual.

Ya que se encuentra poliubiquitinada, la proteína es reconocida por la estructura superior del proteosoma (paso 2, fig. 12-58*c*), que remueve la cadena de ubiquitina y despliega la proteína blanco mediante el empleo de la energía obtenida de la hidrólisis del ATP. El polipéptido desplegado se transfiere luego a través de una abertura reducida en el anillo de las subunidades alfa y pasa a la cámara central del proteosoma (paso 3), donde en casi todas las células se digieren en péptidos pequeños (pasos 4 y 5). Los productos peptídicos se liberan de nuevo al citosol, donde se degradan en sus componentes aminoacídicos.

SINOPSIS

El núcleo de una célula eucariota es una estructura compleja limitada por la envoltura nuclear, que controla el intercambio de materiales entre el núcleo y el citoplasma, y mantiene la composición única de los dos compartimientos principales de la célula. La envoltura nuclear consta de diferentes componentes, incluso una membrana nuclear interna y una externa separadas por un espacio perinuclear y un número variable de poros nucleares. Los poros nucleares son sitios en los que las membranas nucleares interna y externa se fusionan para formar una abertura circular que una estructura compleja conocida como complejo del poro nuclear (NPC) ocupa. La estructura del NPC se asemeja a una canasta con simetría octagonal compuesta de anillos, cubiertas y filamentos. Los poros nucleares son sitios por los cuales los materiales pasan entre el núcleo y el citoplasma. Las proteínas que en condiciones normales residen dentro del núcleo contienen un grupo de aminoácidos llamados señales de localización nuclear (NLS) que les permiten unirse a un receptor (una importina) que los transporta a través del NPC. El transporte nuclear es un proceso de difusión facilitada por un gradiente de la proteína Ran, con Ran-GTP en el núcleo y Ran-GDP en el citoplasma. La superficie interna de la envoltura nuclear se mantiene por una malla fibrilar llamada lámina nuclear, que consiste en proteínas (láminas) que son miembros de la familia de proteínas que forman los filamentos intermedios. El líquido del núcleo se denomina nucleoplasma (pág. 486).

Los cromosomas del núcleo contienen un complejo de DNA definido y proteínas histónicas que forman los filamentos nucleoproteicos característicos y representan el primer paso en el empaquetamiento del material genético. Las histonas son proteínas básicas pequeñas que se dividen en cinco clases distintas. Las histonas y el DNA se organizan en el complejo nuclear del cromosoma, que consiste en dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 rodeadas por casi dos lazadas de DNA. Las partículas de los nucleosomas nucleares se conectan una con otra mediante fragmentos de DNA lineal. Juntos, las partículas nucleares y el DNA de enlace generan un filamento de nucleosoma que semeja una cadena de cuentas de collar. Las modificaciones covalentes de los residuos específicos en las colas de N-terminales del núcleo de histonas (inclusive metilación, acetilación y fosforilación) cumplen una función importante en la determinación del estado de compactación y la actividad transcripcional de la cromatina (pág. 491).

La cromatina no se presenta en las células como un filamento de nucleosoma muy extendido sino que se compacta en niveles superiores de organización. Cada partícula nuclear del nucleosoma contiene una molécula de histona H1 unida al DNA. Tanto el núcleo como las histonas H1 median la interacción entre los nucleosomas vecinos que generan fibras de 30 nm, que representan un nivel superior de organización de la cromatina. Las fibras de 30 nm se organizan a su vez en dominios en forma de asas, que se visualizan cuando los cromosomas mitóticos se someten a procedimientos que remueven las histonas. Los cromosomas mitóticos representan el estado más compactado de la cromatina. Cierta fracción de la cromatina, llamada heterocromatina, permanece en un estado muy compactado a través de la interfase. La heterocromatina se clasifica como heterocromatina constitutiva, que se mantiene condensada en todas las células todo el tiempo, y heterocromatina facultativa, que se inactiva de manera específica durante ciertas fases de la vida de un organismo. Un cromosoma X en cada célula de los mamíferos hembra está sujeto a un proceso de inactivación durante el desarrollo embrionario que lo convierte en un estado de inactividad transcripcional, la heterocromatina facultativa. Como la inactivación del cromosoma X ocurre de manera aleatoria, el cromosoma X derivado de la línea paterna es inactivo en la mitad de las células del embrión,

mientras que el cromosoma X derivado de la madre es inactivo en la otra mitad. Como resultado las hembras adultas son mosaicos genéticos con respecto a los genes presentes en el cromosoma X. La desactivación del cromosoma X es un ejemplo de modificación epigenética, porque es una modificación transmisible en la estructura y la función de la cromatina que no implica un cambio en la secuencia del DNA (pág. 494).

Los cromosomas mitóticos poseen diversas características que pueden reconocerse con claridad. Los cromosomas mitóticos pueden visualizarse mediante el lisamiento de células que se detuvieron en la mitosis y su posterior tinción para generar cromosomas identificables con patrones de banda predecibles. Cada cromosoma mitótico contiene una indentación marcada, conocida como centrómero, que alberga secuencias de DNA muy repetidas y sirve como sitio para la unión de los microtúbulos durante la mitosis. Los extremos de los cromosomas son los telómeros, que se mantienen de una generación de la célula a la siguiente por la acción de una enzima especial llamada telomerasa, que contiene un componente integral de RNA. Los telómeros desempeñan una función importante en el mantenimiento de la integridad cromosómica (pág. 500).

El núcleo es un compartimiento celular ordenado. Las observaciones que apoyan esto incluyen las siguientes: cromosomas específicos se confinan a regiones particulares del núcleo; los telómeros pueden relacionarse con la envoltura nuclear, y los RNP que participan en el *splicing* de pre-mRNA se restringen a sitios particulares. La evidencia indica que la red de filamentos proteicos que conforma la matriz nuclear tiene una función destacada en el mantenimiento de la estructura ordenada del núcleo (pág. 507).

En las bacterias, los genes se organizan en unidades reguladoras denominadas operones. Los operones son grupos de genes estructurales que suelen codificar diferentes enzimas en la misma vía metabólica. Como todos los genes estructurales se transcriben en un solo mRNA, su expresión puede regularse de manera coordinada. El nivel de expresión génica se controla por un compuesto metabólico clave, como el inductor lactosa, que se une a una proteína represora y cambia su forma. Este fenómeno altera la capacidad del represor para unirse con el sitio operador en el DNA y por tanto bloquea la transcripción (pág. 509).

La tasa de síntesis de un polipéptido particular en células eucariotas está determinada por una serie compleja de fenómenos de regulación que operan en especial en tres niveles distintos. 1) Los mecanismos de control transcripcional determinan si un gen se transcribe o no y, si es así, con qué frecuencia; 2) los mecanismos de control a nivel del procesamiento determinan la vía por la que la transcripción primaria de RNA se procesa, y 3) los mecanismos de control traduccional determinan la localización de un mRNA, si un mRNA particular se traduce y, si esto ocurre, con qué frecuencia y durante qué periodo (pág. 513).

Todas las células diferenciadas de los organismos eucariotas retienen toda la información genética. Diferentes genes se expresan en células en diferentes estados de desarrollo, células de tejidos distintos y células expuestas a estímulos diversos. La transcripción de un gen la controlan factores de transcripción, proteínas que se unen a secuencias específicas localizadas en sitios fuera de la región codificante del gen. La secuencia de regulación más cercana corriente arriba es la caja TATA, que es el componente principal del promotor nuclear del gen y es el sitio de ensamble del complejo de preiniciación. Se cree que la actividad de las proteínas en la caja TATA depende de las interacciones con otras proteínas unidas a otros sitios, que incluyen diferentes elementos de respuesta y aumentadores. Los aumentadores se distinguen por el hecho de que pueden moverse de un lugar a otro dentro del DNA o aun en orientación inversa. Algunos aumentadores pueden localizarse a decenas de miles de pares de bases del gen cuya transcripción es estimulada. Se piensa que las asas en el DNA ponen en contacto proteínas unidas a un intensificador y un promotor (pág. 515).

La determinación de la estructura tridimensional de algunos complejos entre factores de transcripción y DNA indica que estas proteínas se unen al DNA por medio de un número limitado de estructuras. Los factores de transcripción suelen contener por lo menos dos dominios, uno cuya función es reconocer y unirse a una secuencia específica de pares de bases en el DNA y otro que activa la transcripción al interactuar con otras proteínas. La mayoría de los factores de transcripción se unen al DNA como dímero, ya sea heterodímeros u homodímeros, que reconocen secuencias en el DNA que poseen simetría doble. Casi todas las estructuras relacionadas que se unen al DNA contienen un segmento, a menudo una hélice alfa, que se inserta en el surco mayor del DNA, donde reconoce la secuencia de pares de bases que reviste el surco. Las estructuras más frecuentes que se observan en las proteínas que se unen al DNA incluyen los dedos de cinc, la hélice-asa-hélice, la cremallera de leucina y la caja HMG. Cada una de estas estructuras proporciona un armazón estable en el que las superficies de reconocimiento específicas del DNA de las proteínas pueden interactuar con la doble hélice de DNA. Aunque es probable que la mayoría de los factores de transcripción sean estimuladores, algunos actúan para inhibir la transcripción (pág. 518).

La activación y la represión de la transcripción están mediadas por un gran número de complejos que funcionan como coactivadores y correpresores. Los coactivadores comprenden complejos que sirven como puentes entre los activadores transcripcionales unidos a los sitios reguladores corriente arriba y la maquinaria de transcripción basal unida al promotor nuclear. Otros tipos de coactivadores modifican el núcleo de las histonas o remodelan la cromatina. La acetilación de las histonas mediante las enzimas acetiltransferasa de histonas (HAT) se relaciona con la activación transcripcional. Los complejos de remodelación de la cromatina (p. ej., SWI/SNF) pueden ocasionar que los nucleosomas se deslicen a lo largo del DNA o modificar el nucleosoma para incrementar su capacidad de unión de proteínas de regulación (pág. 525).

Los genes eucariotas se apagan cuando las bases de citosina de algunos nucleótidos que residen en algunas regiones ricas en GC son metiladas. La metilación es una modificación epigenética y dinámica; existen enzimas que eliminan y adicionan grupos metilo. La adición de grupos metilo al DNA en regiones clave de regulación corriente arriba de los genes se correlaciona con una disminución en la transcripción del gen, en tanto que la deleción de los grupos metilo se correlaciona con un incremento en la transcripción. El proceso de metilación es en particular evidente en la cromatina inactiva con respecto a la transcripción; lo anterior se logra por medio de la heterocromatización, como en la inactivación del cromosoma X en las células de hembra de mamífero. Otro fenómeno vinculado con la metilación del DNA es la huella genómica, que afecta un pequeño número de genes que son transcripcionalmente activos o inactivos en el embrión de acuerdo con su origen parental (pág. 529).

La expresión génica se regula a nivel del procesamiento mediante *splicing* alternativo en el que un solo gen puede codificar para dos o más proteínas relacionadas. Muchas transcripciones primarias pueden procesarse por más de una vía, lo que genera mRNA que contiene diferentes combinaciones de exones. En el caso más simple un intrón específico puede eliminarse de la transcripción o retenerse como parte del mRNA final. Al parecer la vía específica que se toma durante el procesamiento del pre-mRNA depende de la presencia de proteínas que controlan los sitios de procesamiento que se identifican para el corte (pág. 531).

La expresión génica se regula a nivel traduccional mediante diferentes procesos que incluyen la localización del mRNA, el control de la traducción de los mRNA existentes y la longevidad del mRNA. La mayoría de estas actividades de regulación está mediada por interacciones con las regiones no traducidas (UTR) 5′ y 3′ del mRNA. Por ejemplo, al parecer la localización citoplásmica del mRNA en regiones

específicas de los huevecillos de la mosca de la fruta es mediada por proteínas que reconocen las secuencias de localización en 3′ UTR. La presencia de un mRNA en el citoplasma no garantiza su traducción. La maquinaria de síntesis de proteínas de una célula puede controlarse de manera global de tal forma que la traducción de todos los mRNA se afecta, o la traducción de mRNA específicos puede ser controlada, como ocurre en la regulación de la síntesis de ferritina por los niveles de hierro que actúan en las proteínas que se unen en el 5′ UTR del mRNA de ferritina. Uno de los principales factores que controlan la longevidad (estabilidad) de los mRNA es la longitud de las colas de poli(A). Nucleasas específicas en la célula acortan de modo gradual la cola de poli(A) hasta el punto en que las proteínas protectoras no pueden unirse a la cola. Una vez que la proteína protectora se pierde, los mRNA se degradan en las direcciones 5′ → 3′ y 3′ → 5′ (pág. 532).

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. La metilación de K9 de la histona H3 (mediante una enzima SUV39H1) se relaciona con la heterocromatización y el silenciamiento génico. Se informa que es posible que la metilación de H3 por otras enzimas conduzca a la activación transcripcional. ¿Cómo puede generar efectos opuestos la metilación?
2. ¿De qué manera muchas copias de cada tipo de núcleo histónico pueden embobinar el genoma humano entero en los nucleosomas? ¿Cómo resolvió la evolución el problema de producir gran número de proteínas en un periodo hasta cierto punto corto?
3. Supóngase que se descubre una mutante sensible a la temperatura cuyo núcleo no puede acumular ciertas proteínas nucleares específicas a una temperatura elevada (restrictiva) pero continúa acumulando otras proteínas nucleares. ¿Qué conclusiones pueden obtenerse respecto a la localización nuclear y la naturaleza de esta mutación?
4. Los humanos que nacen con tres cromosomas X pero carecen de cromosomas Y a menudo se desarrollan como mujeres de apariencia normal. ¿Cuántos corpúsculos de Barr se espera encontrar en las células de estas mujeres? ¿Por qué?
5. Supóngase que la inactivación del cromosoma X no fuera un proceso aleatorio sino que siempre se inactivara el cromosoma X que proviene del padre. ¿Qué efecto se esperaría en el fenotipo de las mujeres?
6. Los cromosomas que se muestran en la figura 12-18*b* se marcaron por incubación de la preparación con fragmentos de DNA específicos para cada cromosoma. Supóngase que uno de los cromosomas en el campo contiene regiones de dos colores diferentes. ¿Qué puede concluirse respecto a este cromosoma?
7. ¿Qué ventaja se obtiene al sintetizar y procesar las transcripciones en ciertas regiones del núcleo en lugar de que este proceso se realice de manera aleatoria a lo largo del nucleoplasma?
8. Comparar y analizar los efectos de una deleción en el operador del operón lactosa con una deleción en el operón triptófano.
9. Se encontró una mutante de *E. coli* que generó cadenas continuas de polipéptidos que contienen tanto galactosidasa beta como permeasa de galactósido (codificada por el gen *y*), ¿cómo se explica lo anterior?
10. Se sospecha que una hormona nueva que se somete a prueba funciona para estimular la síntesis de miosina al actuar a nivel de la transcripción. ¿Qué tipo de evidencia experimental se necesita para apoyar esta afirmación?
11. Asúmase que se efectúa una serie de experimentos en los que se trasplantan núcleos de diferentes células de tejidos adultos a un huevo de ratón enucleado y activado, y se encuentra que el huevo no se desarrolla más allá de la etapa de blastocisto. ¿Podría concluirse que el núcleo trasplantado perdió los genes necesarios para el desarrollo posterior de la blástula? ¿Por qué sí o por qué no? ¿Por qué razón este tipo de experimentos proporciona más información para la interpretación de resultados negativos?
12. Como se señaló en la página 523, el *footprinting* de DNA permite el aislamiento de secuencias de DNA unidas por factores de transcripción específicos. Describir un protocolo experimental para identificar los factores de transcripción que se unen a la secuencia aislada de DNA. (Deben considerarse las técnicas que se estudian en la sección 18.7)
13. ¿Cómo se explica que los aumentadores puedan moverse a diferentes posiciones en el DNA sin que su actividad se afecte en tanto que la caja TATA sólo puede operar en un sitio específico?
14. Supóngase que se trabaja con una cepa celular que presenta un nivel muy bajo de síntesis de proteínas y se sospecha que las células están sujetas a control inhibidor global de la traducción. ¿Qué experimentos deben realizarse para determinar si este es el caso?
15. Las señales de secuencias que dirigen la translocación de proteínas en el retículo endoplásmico son eliminadas por una señal de peptidasa, en tanto que los NLS y los NES que se requieren para el movimiento de una proteína hacia adentro o hacia afuera del núcleo permanecen como parte de esta proteína. Considérese una proteína como hnRNPA1, que participa en la exportación del mRNA al citoplasma. ¿Por qué es importante que las señales de secuencias de transporte de esta proteína permanezcan como parte de la misma en tanto que la señal de secuencia del ER puede eliminarse?
16. Cuando un DNA metilado se introduce en células de mamífero en cultivo por lo general se transcribe por un periodo antes que se reprima. ¿Por qué debe esperarse este tipo de retraso previo a que la inhibición de la transcripción ocurra?
17. Supóngase que se aisló un nuevo factor transcripcional y se quiere conocer qué genes podrían regular esta proteína. Pueden utilizarse diferentes estrategias como un microordenamiento de cDNA como el que se muestra en la figura 12-34 para contestar esta pregunta. (Nota: el microordenamiento de la figura 12-34 contiene DNA de regiones que codifican proteínas, a diferencia del de la figura 12-42).
18. Aunque se han clonado diferentes especies de mamífero, la eficiencia de este proceso es muy baja. A menudo decenas o cientos de oocitos deben implantarse con núcleos donantes para obtener productos vivos sanos. Muchos investigadores creen que los problemas con la clonación residen en las modificaciones epigenéticas, como la metilación del DNA, que ocurren en diferentes células durante la vida de un organismo. ¿De qué manera tales modificaciones pueden afectar los sucesos de un experimento como el de la figura 12-31?
19. En un estudio reciente publicado en una revista médica británica se encontró una correlación en la longitud de telómeros de padres e hijas y de madres e hijos de ambos sexos, pero no de padres e hijos. ¿Cómo puede explicar este descubrimiento?

SITIO EN INTERNET www.wiley.com/college/karp

Las animaciones y los videos indicados en este capítulo pueden visitarse en el sitio de Cell and Molecular Biology de Karp en Internet. También hallará todas las respuestas a las preguntas analíticas recién planteadas, autoexámenes que le ayudarán a prepararse para los exámenes, y vínculos con fascinantes recursos. La sección lecturas adicionales que sigue se amplía en el sitio en Internet.

LECTURAS ADICIONALES

Amor, D. J., et al. 2004. Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization. *Trends Cell Biol.* 14:359–364.

Ast, G. 2005. The alternative genome. *Sci. Am.* pp. 58–65. April [empalme alternativo.]

Bernstein, E. & Allis, C. D. 2005. RNA meets chromatin. *Genes Develop.* 19:1635–1655. [iRNA y heterocromatina.]

Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Develop.* 6:16–21.

Blasco, M. A. 2005. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Revs. Gen.* 6:611–622.

Blencowe, B. J. 2006. Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* 126:37–47.

Bruno, I. & Wilkinson, M. F. 2006. P-bodies react to stress and nonsense. *Cell* 125:1036–1038.

Carrel, L. 2006. "X"-rated chromosomal rendezvous. *Science* 311:1107–1109.

Carroll, C.W. & Straight, A.F. 2006. Centromere formation: from epigenetics to self-assembly. *Trends Cell Biol.* 16:70–78.

Cech, T. R. 2004. Beginning to understand the end of the chromosome. *Cell* 116:273–279.

Chow, J. C., et al. 2005. Silencing of the mammalian X chromosome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Gen.* 6:69–92.

Ciechanover, A. 2005. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 6:79–86.

da Rocha, S.T. & Ferguson-Smith, A. C. 2004. Genomic imprinting. *Curr. Biol.* 14:R646–R649.

Dell, H., et al. 2005. Milestones in gene expression. *Nature Revs. Gen.* Dec. Suppl.

Elgin, S. C. R. & Grewal, S. I. S. 2003. Heterochromatin: silence is golden. *Curr. Biol.* 13:R895–R898.

Goldberg, A. L. 2005. Nobel committee tags ubiquitin for distinction. *Neuron* 45:339–344.

Greider, C. W. & Blackburn, E. H. 2004. Tracking telomerase. *Cell* S116:S83–S86. [sobre el descubrimiento de la telomerasa.]

Gruenbaum, Y., et al. The nuclear lamina comes of age. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 6:21–31.

Handwerger, K. E. & Gall, J. G. 2006. Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends Cell Biol.* 16:19–26.

Houseley, J., et al. 2006. RNA-quality by the exosome. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 7:529–539.

Jasny, B. R., et al. 2004. Solving gene expression. *Science* 306:629–650. [artículos sobre transcripción.]

Kadonaga, J. T. 2004. Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA-binding factors. *Cell* 116:247–257.

Kamakaka, R. T. & Biggins, S. 2005. Histone variants: deviants? *Genes Develop.* 19:295–310.

Khorasanizadeh, S. 2004. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 116:259–272.

Klose, R. J. & Bird, A. P. 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* 31:89–97.

Klug, A., et al. 2005. Reviews on eukaryotic transcription and chromatin. *FEBS Lett*. 579:890–915.

Kornberg, R. D., et al. 2005. Special issue on Mediator. *Trends Biochem. Sci.* 30:235–271.

Kutay, U. & Mühlhaüsser, P. 2006. Taking a turn into the nucleus. *Science* 442:991–992. [sobre la envoltura nuclear.]

Lareau, L. F., et al. The evolving roles of alternative splicing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14:273–282.

LeBel, C. & Wellinger, R. J. 2005.Telomeres: what's new at your end? *J. Cell Sci.* 118:2785–2788.

Luger, K. & Hansen, J. C. 2005. Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15:188–196.

Martin, C. & Zhang, Y. 2005. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 6:838–849.

Meyer, B. & Widom, J., eds. 2005. Chromosomes and gene expression mechanisms. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 15#2.

Moore, M. J. 2005. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 309:1514–1518.

Nudler, E. 2006. Flipping roboswitches. *Cell* 126:19–22.

Parker, R. & Song, H. 2004. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nature Struct. Mol. Biol.* 11:121–127.

Pederson, T. & Singer, R. H., eds. 2006. Nucleus and gene regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:#3.

Peterson, C. L. & Laniel, M.-A. 2004. Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* 14:R546–R551.

Pickart, C. M. & Cohen, R. E. 2004. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 5:177–187.

Ptashne, M. 2005. Regulation of transcription: from lambda to eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 30:275–279.

Reichow, S. & Varani, G. 2006. RNA switches function. *Nature* 441:1054–1055. [ribointerruptores.]

Richmond, T. J. 2006. Predictable packaging. *Nature* 442:750–752. [sobre colocación de nucleosomas.]

Rout, M. P., et al. 2003. Virtual gating and nuclear transport: the hole picture. *Trends Cell Biol.* 13:622–628.

Saha, A., et al. 2006. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 7:437–447.

St Johnston, D. 2005. Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 6:363–375.

Studitsky, V. M., et al. 2004. Chromatin remodeling by RNA polymerases. *Trends Biochem. Sci.* 29:127–135.

Taddei, A. 2004. The function of nuclear architecture. *Annu. Rev. Gen.* 38:305–345.

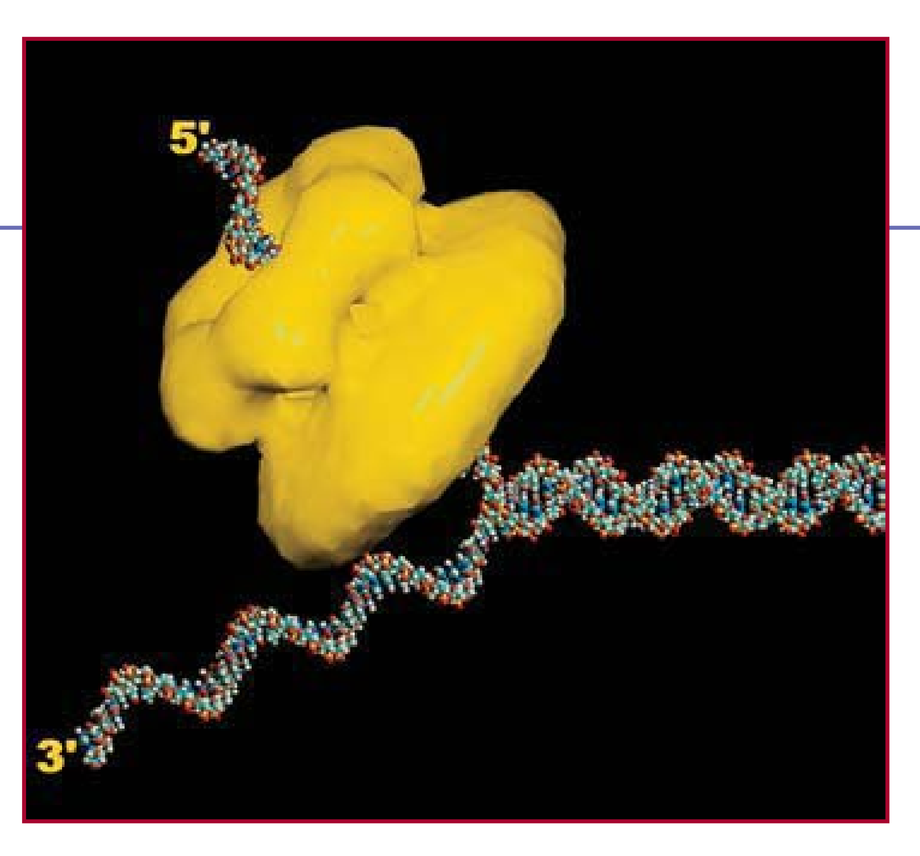
Tran, E. J. & Wente, S. R. 2006. Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell* 125:1041–1053.

von Hippel, P. H. 2004. Completing the view of transcriptional regulation. *Science* 305:350–351.

Weigel, D. & Izaurralde, E. 2006. A tiny helper lightens the maternal load. *Cell* 124:1117–1118. [sobre el cometido de microRNA en la degradación del mRNA.]

Woodcock, C. L. 2006. Chromatin architecture. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16:213–220.

CAPÍTULO 13



Replicación y reparación del DNA

La reproducción es una propiedad fundamental de todos los sistemas vivos. Es un proceso que puede observarse en diferentes niveles: los organismos se duplican por medio de la reproducción sexual o asexual, las células por división celular y el material genético por **replicación del DNA** (ácido desoxirribonucleico). La maquinaria que replica el DNA también tiene otra capacidad: la reparación del material genético dañado. Estos dos procesos (duplicación y reparación del DNA) son los temas de este capítulo.

Se presume que la capacidad de autorreplicación fue una de las primeras propiedades importantes que aparecieron durante la evolución de las formas de vida primitiva más tempranas. Sin la capacidad de propagarse, cualquier molécula biológica primitiva estaba destinada a desaparecer. Los portadores tempranos de la información genética fueron tal vez las moléculas de RNA (ácido ribonucleico), capaces de autorreplicarse. A medida que la evolución progresó y las moléculas de RNA se remplazaron por moléculas de DNA como material genético, el proceso de la replicación adquirió complejidad y requirió un gran número de componentes auxiliares. En consecuencia, a pesar de que una molécula de DNA contiene la información para su propia duplicación, carece de la capacidad para realizar esta actividad por sí misma. Como Richard Lewontin expresó, "la imagen común del DNA como molécula autorreplicante se describe de mejor forma como una carta que se autoduplica. La carta necesita una fotocopiadora; el DNA necesita una célula". A continuación se describe la forma en que las células llevan a cabo esta actividad.

Modelo tridimensional de una helicasa de DNA codificada por el bacteriófago T7. La proteína consta de un anillo de seis subunidades. Cada subunidad contiene dos dominios. En este modelo, el agujero central rodea sólo una de las dos cadenas de DNA. Impulsada por la hidrólisis de ATP, la proteína se mueve en sentido 5′ → 3′ a lo largo de la cadena a la cual está unida, con lo que desplaza la cadena complementaria y desenrolla el dúplex. La actividad de helicasa de DNA es necesaria para la duplicación del DNA. (Cortesía de Edward H. Egelman, University of Virginia.)

13.1 REPLICACIÓN DEL DNA

La estructura que propusieron Watson y Crick en 1953 para el DNA incluía un mecanismo que sugería su "autoduplicación". Las dos cadenas de la doble hélice se mantienen juntas por medio de puentes de hidrógeno entre las bases. De manera individual, estos puentes de hidrógeno son débiles y pueden romperse con facilidad. Watson y Crick supusieron que la replicación ocurría por separación gradual de las cadenas de la doble hélice (fig. 13-1), algo muy semejante a la separación de las dos mitades de una cremallera. Debido a que las dos cadenas son complementarias la una de la otra, cada cadena contiene la información requerida para la construcción de la otra. Una vez que las cadenas se separan, cada una puede actuar como molde para dirigir la síntesis de la cadena complementaria y restaurar el estado de doble cadena.

Replicación semiconservadora

La propuesta de Watson y Crick había establecido ciertas predicciones acerca de la conducción del DNA durante la replicación. De acuerdo con esta propuesta, cada uno de los dúplex hijos debía consistir en una cadena completa heredada del dúplex parental y una cadena completa sintetizada de nueva cuenta. La replicación de este tipo (fig. 13-2, esquema 1) se dice que es **semiconservadora** puesto que cada dúplex descendiente contiene una cadena de la estructura parental. En ausencia de información del mecanismo encargado de la replicación, se

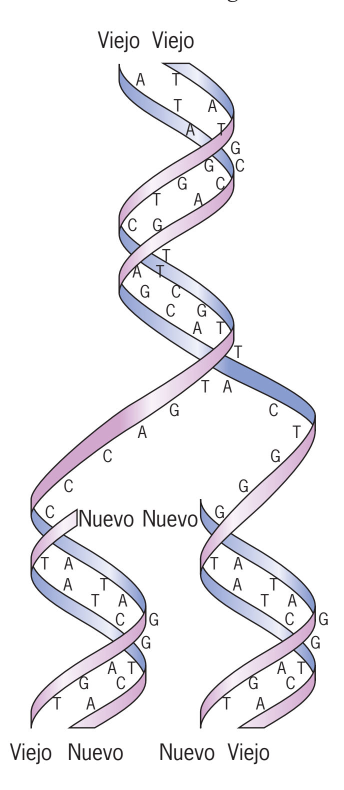


FIGURA 13-1 **Propuesta original de Watson y Crick para la duplicación de una molécula de doble hélice de DNA.** Durante la duplicación, la doble hélice se desenrolla, y cada una de las cadenas paternas sirve como plantilla para la síntesis de una nueva cadena complementaria. Como se expone en este capítulo, estos dogmas básicos se han cumplido.

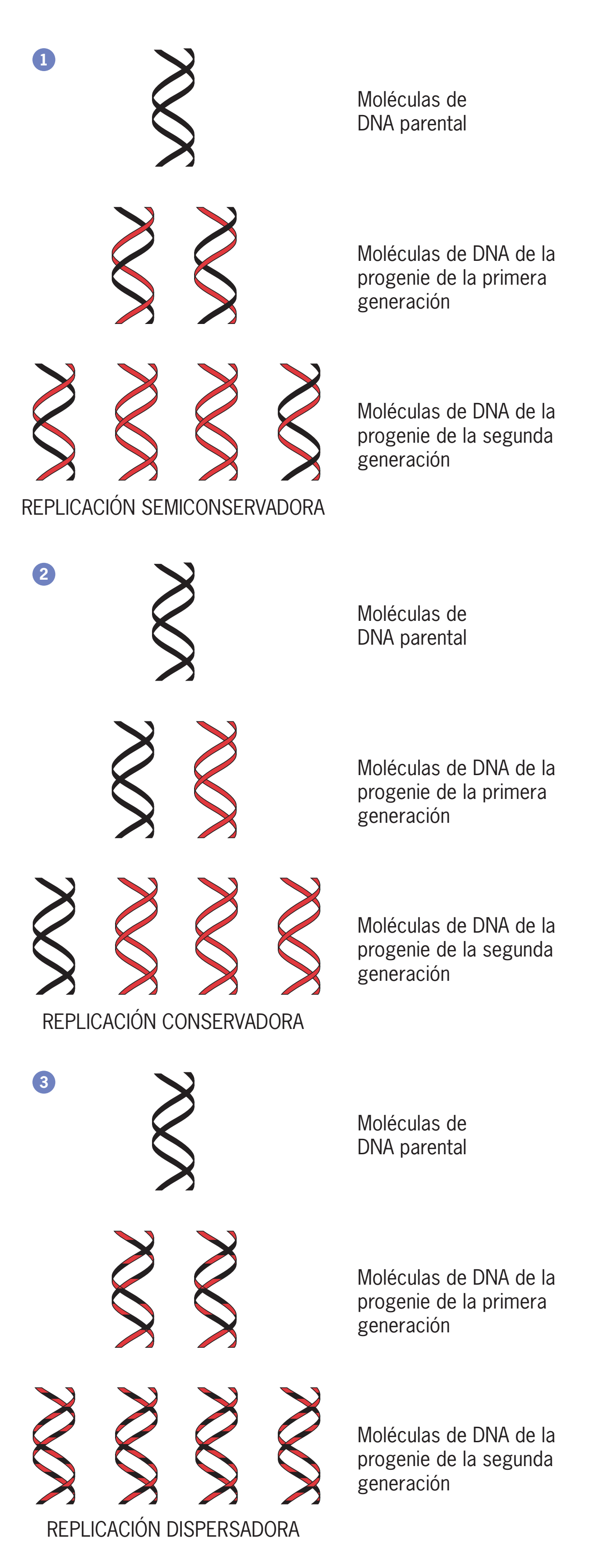
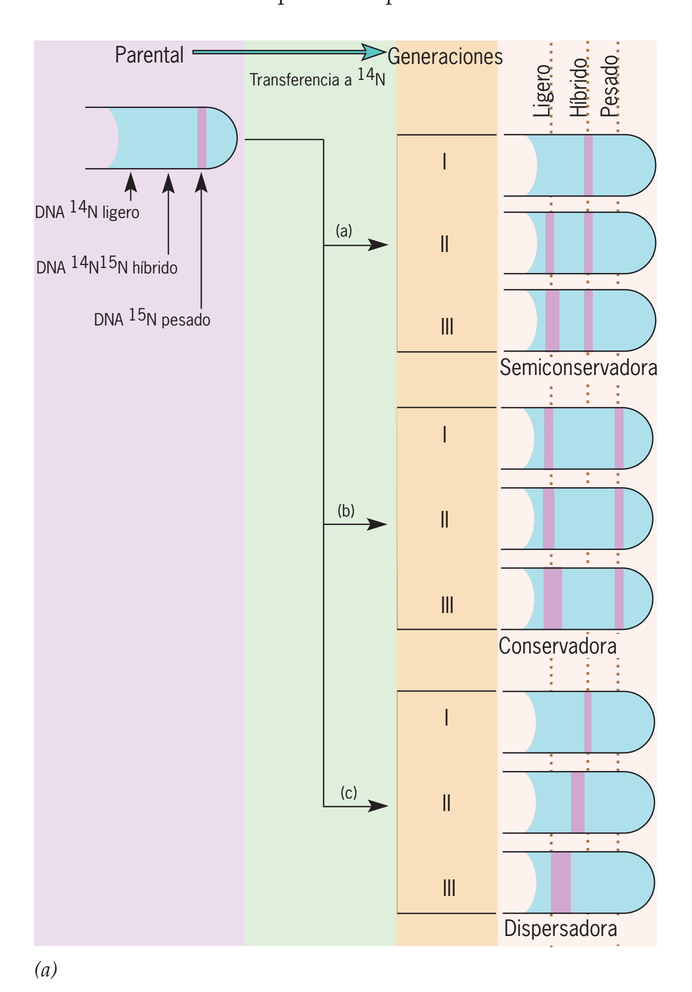


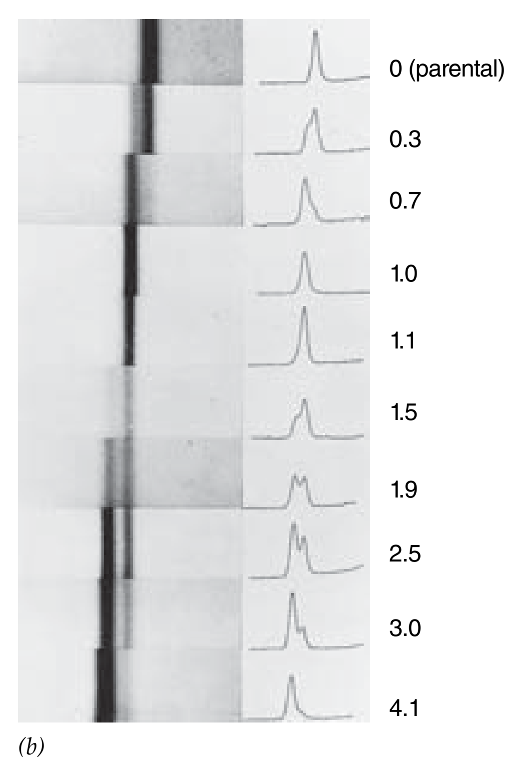
FIGURA 13-2 **Tres esquemas alternativos de la replicación.** La replicación semiconservadora se muestra en el esquema 1, la replicación conservadora en el 2 y una replicación dispersadora en el 3. En el texto se describen los tres modos alternos de replicación.

consideraron otras dos propuestas relacionadas con este proceso. En la replicación *conservadora* (fig. 13-2, esquema 2), las dos cadenas originales debían permanecer juntas (después de servir como moldes), así como también las dos cadenas sintetizadas de nuevo. Como resultado, una de las cadenas dúplex hijas debía contener sólo el DNA parental, mientras que las otras dúplex hijas, sólo el DNA resintetizado. En la replicación *dispersadora* (fig. 13-2, esquema 3), las cadenas parentales deben cortarse en fragmentos y las nuevas cadenas sintetizarse en segmentos cortos. Por consiguiente, los fragmentos previos y los nuevos deben unirse para formar cadenas completas. Como resultado, los dúplex hijos contendrían cadenas constituidas por DNA nuevo y antiguo. A primera vista, la replicación dispersadora luce como una solución improbable, pero a Max Delbrück le pareció la única forma de evadir la al parecer imposible tarea de desenrollar las dos cadenas de DNA dúplex para su replicación (como se analiza en la página 547).

Para decidir entre estas tres posibilidades fue necesario distinguir las cadenas de DNA sintetizadas de nueva cuenta a partir de las cadenas de DNA original que sirvieron como moldes. Esto lo llevaron a cabo en 1957 Matthew Meselson y Franklin Stahl del *California Institute of Technology* en estudios que utilizaron bacterias e isótopos de nitrógeno pesado (^{15}N) y ligero (^{14}N) para distinguir entre las cadenas de DNA parentales y las resintetizadas (fig. 13-3). Estos investigadores cultivaron bacterias en un medio que contenía cloruro de amonio-^{15}N como única fuente de nitrógeno y, por consiguiente, las bases nitrogenadas del DNA de estas células sólo contenían el isótopo pesado de nitrógeno. Los cultivos de bacterias "pesadas" se lavaron para liberarlas del medio antiguo y se incubaron en medio fresco con compuestos ligeros que contenían ^{14}N y que luego se removieron a intervalos crecientes durante un periodo de varias generaciones. Se extrajo el DNA de las muestras de bacterias y se sometió a centrifugación de equilibrio de gradiente de densidad (sección 18.35). En este procedimiento, el DNA se mezcla



(a)



(b)

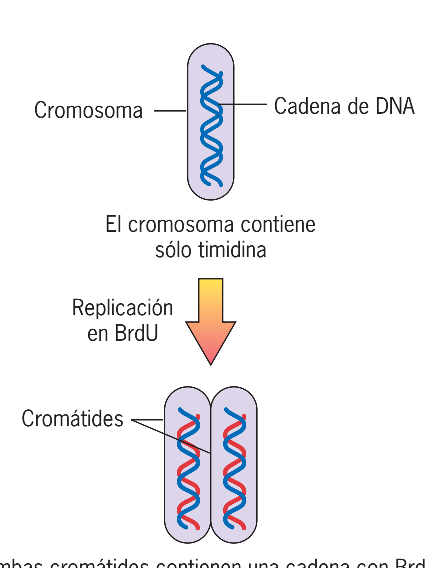
FIGURA 13-3 Demostración experimental de que la replicación del DNA en bacterias es semiconservadora. El DNA se extrajo de la bacteria en diferentes fases del experimento, se mezcló con una solución concentrada de cloruro de cesio (CsCl) y se centrifugó hasta el equilibrio a alta velocidad en una ultracentrífuga. Los iones de cesio tienen suficiente masa atómica para afectarse por la fuerza de centrifugación y forman un gradiente de densidad durante el periodo de centrifugación con la concentración más baja (más baja densidad) de cesio en la parte superior del tubo y la concentración más alta (más alta densidad) en la parte inferior del tubo. Durante la centrifugación, los fragmentos de DNA en el tubo se localizan en una posición que tiene una densidad igual a la suya propia, que a su vez depende de la relación de $^{15}N/^{14}N$ presente en sus nucleótidos. Cuanto más grande sea el contenido del ^{14}N, mayores son los fragmentos de DNA en equilibrio en el tubo. *a*) Resultados esperados en este tipo de experimento para cada uno de los tres posibles esquemas de replicación. El tubo único de la izquierda indica la posición del DNA parental y las posiciones en las cuales los fragmentos de DNA ligeros o híbridos deberían generar las bandas. *b*) Resultados experimentales obtenidos por Meselson y Stahl. La apariencia de una banda de híbrido y la desaparición de la banda pesada después de una generación eliminan la replicación conservadora. La aparición posterior de las dos bandas, una ligera y una híbrida, elimina el esquema dispersador. (*B*, TOMADA DE M. MESELSON Y F. STAHL, PROC NAT'L ACAD SCI USA 44:671, 1958.)

con una solución concentrada de cloruro de cesio y se centrifuga hasta que las moléculas de doble cadena de DNA entran en equilibrio de acuerdo con su densidad.

En el experimento de Meselson-Stahl, la densidad de una molécula de DNA es directamente proporcional al porcentaje de átomos que contiene de ^{15}N o ^{14}N. Si la replicación es semiconservadora, cabría esperar que la densidad de las moléculas del DNA disminuyera durante el cultivo en el medio que contiene nitrógeno 14 (^{14}N), como se muestra en los tubos de centrifugación de la parte superior de la figura 13-3*a*. Después de una generación, todas las moléculas de DNA deben ser híbridas, ^{15}N-^{14}N, y su densidad de flotación debe ser la mitad entre las esperadas para las cadenas pesadas y las ligeras de DNA (fig. 13-3*a*). Conforme la replicación continúa más allá de la primera generación, las cadenas sintetizadas de nueva cuenta deben contener aún sólo los isótopos ligeros y aparecer dos tipos de dúplex en los gradientes: los que contienen híbridos ^{15}N-^{14}N y los que poseen sólo ^{14}N. A medida que prosigue el crecimiento en el medio de cultivo ligero, un porcentaje cada vez mayor de las moléculas de DNA presentes debe corresponder a las ligeras. Sin embargo, si la replicación es todavía semiconservadora, las cadenas pesadas progenitoras originales deben permanecer intactas y presentes en las moléculas de DNA híbridas que representan cada vez un porcentaje más y más pequeño del DNA total (fig. 13-3*a*). Los resultados de los experimentos del gradiente de densidad obtenidos por Meselson y Stahl se muestran en la figura 13-3*b* y demuestran de modo inequívoco que la replicación tiene lugar de manera semiconservadora. Los resultados que debieron obtenerse si la replicación ocurriera por los mecanismos conservadores o dispersadores se indican en los dos grupos de tubos de centrifugación de la figura 13-3*a*.[1]

Hacia 1960 ya se había demostrado que la duplicación ocurre de manera semiconservadora también en eucariotas. Los experimentos originales fueron realizados por J. Herbert Taylor de la *Columbia University*. Pronto se demostró que la replicación semiconservadora también sucede en células eucariotas. El dibujo y la fotografía de la figura 13-4 muestran los resultados de un

[1] El lector interesado en explorar las circunstancias que llevaron a este anunciado esfuerzo de investigación y examinar los giros y desvíos experimentales que se presentaron puede consultar el libro de Frederick Lawrence Holmes, *Meselson, Stahl, and the Replication of DNA*, 2001. En *PNAS* 101:17889, 2004, disponible en Internet, puede consultarse una exposición del experimento.



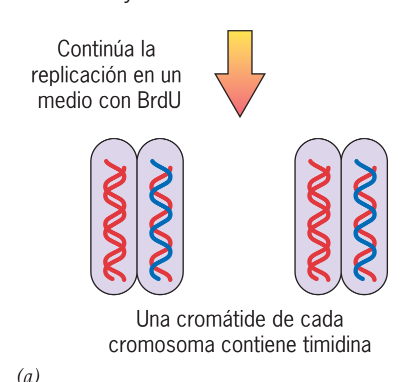


FIGURA 13-4 Demostración experimental de que la replicación del DNA en células eucariotas es semiconservadora. *a*) Diagrama esquemático de los resultados de un experimento en el cual las células se transfirieron de un medio que contenía timidina, a uno con bromodesoxiuridina (BrdU) y se permitió completar los dos ciclos sucesivos de replicación. Las cadenas de DNA que contienen BrdU se muestran en rojo. *b*) Resultados de un experimento similar al de *a*. En este experimento, las células de mamífero cultivadas crecieron en BrdU por dos ciclos de replicación antes que los cromosomas mitóticos se prepararan y tiñeran con colorantes fluorescentes y tinción de Giemsa. Mediante este procedimiento, las cromátides que contienen timidina dentro de una o ambas cadenas se tiñen de oscuro y las que poseen sólo BrdU presentan una coloración ligera. La fotografía indica que, tras *dos* ciclos de replicación en BrdU, una cromátide de cada cromosoma duplicado contiene sólo BrdU, mientras que el otro muestra una cadena de DNA marcado con timidina. (Algunos de los cromosomas experimentan intercambio de porciones homólogas entre las cromátides hermanas. Este proceso de intercambio de cromátides hermanas es común durante la mitosis, pero no se discute en el texto.) (*B*, CORTESÍA DE SHELDON WOLFF.)

experimento más reciente en el cual se permitió que las células de mamífero cultivadas realizaran replicación en presencia de bromodesoxiuridina (BrdU), un compuesto que se incorpora en el DNA en lugar de la timidina. Después de la replicación, un cromosoma se conforma de dos cromátides. Luego de un ciclo de replicación en BrdU, las dos cromátides de cada cromosoma contienen BrdU (fig. 13-4*a*). Tras dos ciclos de replicación en BrdU, una de las cromátides de cada cromosoma presentó dos cadenas con BrdU, si bien la otra cromátide era un híbrido que consistía en una cadena que contenía BrdU y una cadena con timidina (fig. 13-4*a*, *b*). Esta última cadena había sido parte de la molécula de DNA parental original antes de la adición de la BrdU al cultivo.

Replicación en células bacterianas

En esta sección del capítulo se describen las células bacterianas, toda vez que la replicación procariota es más fácil de entender que el proceso correspondiente de los eucariotas. Los primeros avances de la investigación en bacterias fueron impulsados por técnicas genéticas y bioquímicas como las siguientes:

- Disponibilidad de mutantes que no pueden sintetizar una u otra proteína requerida para el proceso de replicación. El aislamiento de mutantes incapaces de replicar su cromosoma puede parecer paradójico: ¿cómo pueden las células con un defecto en este proceso vital cultivarse? La paradoja se ha resuelto al obtener mutantes **sensibles a la temperatura (ts)**, en los que la deficiencia sólo es evidente a una temperatura elevada, denominada temperatura *no permisiva* (o *restrictiva*). Cuando estas bacterias crecen a baja temperatura (*permisiva*), la proteína mutante puede funcionar de manera adecuada para realizar su actividad requerida y las células pueden continuar su crecimiento y división. Se han aislado mutantes sensibles a la temperatura que afectan virtualmente todos los tipos de actividad fisiológica (véase pág. 279) y estas mutantes han sido de particular importancia en el estudio de la síntesis de DNA, tal y como opera durante la replicación, la reparación del DNA y la recombinación genética.
- Desarrollo de sistemas in vitro en los cuales la replicación se puede estudiar mediante componentes celulares purificados. En algunos estudios, las moléculas de DNA al replicarse se incuban con extractos celulares de los cuales se eliminan las proteínas específicas con sospecha de ser esenciales para la función. En otros estudios, el DNA se incuba con una gran variedad de proteínas purificadas cuya actividad está bajo prueba.

En conjunto, estas técnicas han revelado la actividad de al menos 30 proteínas diferentes requeridas para la replicación del cromosoma de *E. coli*. En las siguientes páginas se discuten las actividades de varias de estas proteínas cuyas funciones se han definido con claridad. La replicación en procariotas y eucariotas tiene lugar por mecanismos muy similares y de esta forma la mayor parte de la información que se presenta en la discusión de la replicación bacteriana se aplica también a las células eucariotas.

Horquillas de replicación y replicación bidireccional La replicación comienza en un sitio específico en el cromosoma bacteriano conocido como el **origen**. El origen de replicación en el cromosoma de *E. coli* es una secuencia específica llamada *oriC* en la que diferentes proteínas se unen para **iniciar** el proceso de replicación.[2] Tras comenzar, la replicación se aleja del origen en ambas direcciones, es decir, en forma *bidireccional* (fig. 13-5). Los puntos en la figura 13-5 donde el par de segmentos replicados se une con los segmentos no replicados se denominan **horquillas de replicación**. Cada horquilla de replicación corresponde al sitio donde: a) la doble hélice parental se separa y b) los nucleótidos se incorporan en las cadenas complementarias resintetizadas. Las dos horquillas de replicación se mueven en

[2] El tema del inicio de la replicación se analiza con detalle en la página 557 del modo como ocurre en eucariotas.

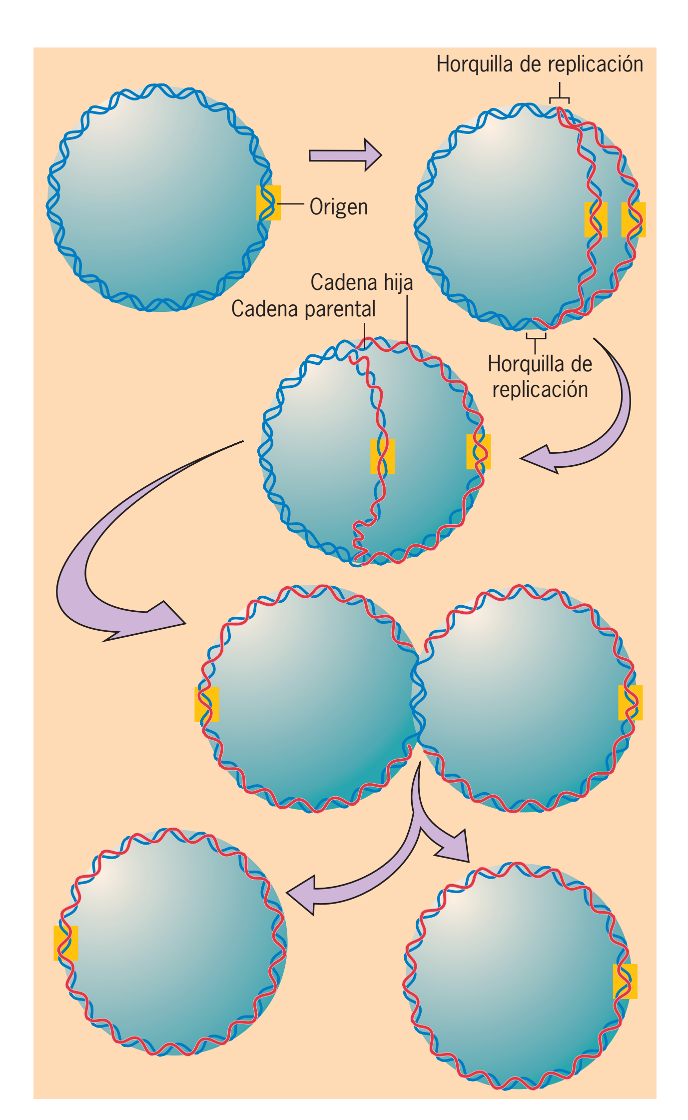


FIGURA 13-5 Modelo de un cromosoma circular que sufre replicación semiconservadora bidireccional. Dos horquillas de replicación se mueven en direcciones opuestas desde un solo origen. Cuando las horquillas de replicación se hallan en el punto opuesto del círculo, se termina la replicación y los dos dúplex replicados se despegan el uno del otro. Las nuevas cadenas de DNA se muestran en rojo.

direcciones opuestas hasta que llegan a un punto a través del círculo desde el origen, donde la replicación concluye. Las dos cadenas dúplex, replicadas de nueva cuenta se separan una de la otra y al final se segregan a las células hijas.

Desenrollamiento del dúplex y separación de las cadenas La separación de las cadenas de un DNA dúplex circular tiene diferentes problemas topológicos. Para visualizar las dificultades hay que observar primero la analogía entre un DNA dúplex y un fragmento de cuerda de doble hélice. Considérese lo que sucedería si se colocara un fragmento de cuerda en una pared, sujetada por un gancho en un extremo, y se separaran las dos hebras que conforman la cuerda, algo semejante a lo que sucede al separar las dos cadenas de DNA durante la replicación. Es obvio que la separación de las cadenas de la doble hélice sufre un proceso de *desenrollamiento* de la estructura. En el caso de la cuerda, que puede rotar con libertad alrededor de su eje, la separación de las cadenas a partir de un extremo se acompaña de un movimiento de rotación de toda la fibra como medio de oponerse al desarrollo de la tensión dentro de la estructura. ¿Qué pasaría si se separan las cadenas cuando el extremo de la tira está fijado a un gancho en la pared (fig. 13-6*a*)? Bajo estas circunstancias, la separación de las dos cadenas a partir del extremo libre genera una fuerza de torsión creciente en la cuerda y provoca que la porción no separada se enrolle cada vez de modo más apretado. La separación de las dos cadenas de una molécula de DNA circular (o una molécula lineal que no pueda girar con libertad, como ocurre con un gran cromosoma eucariota) es análoga a tener un extremo de la molécula lineal fijado a la pared; en todos estos casos, la tensión que se desarrolla dentro de la molécula no puede liberarse por rotación de toda la molécula. A diferencia de la cuerda, que puede quedar apretadamente sobrenrollada (como en la figura 13-6*a*), una molécula de DNA sobrenrollada adquiere un superenrollamiento positivo (pág. 400). Por tanto, el movimiento de la horquilla de replicación genera un superenrollamiento positivo en la porción no replicada del DNA por delante de la horquilla (fig. 13-6*b*). Cuando se considera que un cromosoma circular completo de *E. coli* contiene alrededor de 400 000 vueltas y lo duplican dos horquillas de replicación en 40 min, la magnitud del problema es evidente.

En la página 400 se mencionó que las células contienen enzimas, llamadas topoisomerasas, capaces de cambiar el estado de superenrollamiento de la molécula de DNA. Una enzima de este tipo, denominada **girasa de DNA**, una topoisomerasa tipo II, libera la tensión mecánica que se crea durante la replicación en *E. coli.* Las moléculas de la girasa de DNA se desplazan a lo largo del DNA por delante de la horquilla de replicación y eliminan los superenrollamientos positivos. La girasa de DNA realiza esta tarea al cortar las dos cadenas del DNA dúplex; un segmento del DNA pasa a través de la rotura de la doble cadena hacia el otro lado y entonces se ligan los cortes de nueva cuenta, un proceso que se lleva a cabo por liberación de energía durante la hidrólisis de ATP ([trifosfato de adenosina] y se muestra con detalle en la figura 10-14*b*). Las células eucariotas poseen enzimas similares que realizan esta función.

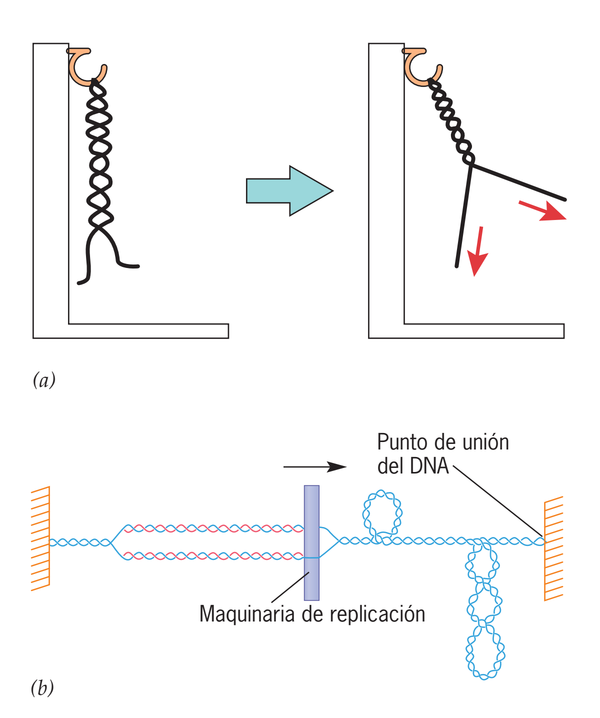


FIGURA 13-6 El problema del desenrollamiento. *a*) Efecto de desenrollar dos haces de una cuerda en la que uno de sus extremos está unido a un gancho. La porción no separada es la que se enrolla de manera más estrecha. *b*) Cuando una molécula de DNA circular o unida se replica, el DNA se sobrenrolla antes de la replicación y acumula enrollamientos positivos. Las células poseen topoisomerasas, como la girasa de DNA de *E. coli* que remueve los superenrollamientos positivos. (*B*, REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE J. C. WANG, NATURE REVIEWS MOL CELL BIOL 3:434, 2002; © 2002 MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)

Las propiedades de las polimerasas de DNA Se analizan primero el mecanismo de la replicación del DNA y algunas propiedades de las **polimerasas de DNA**, las enzimas que sintetizan nuevas cadenas de DNA. Arthur Kornberg de la *Washington University* comenzó en la década de 1950 los estudios de estas enzimas. En sus experimentos iniciales, Kornberg y sus colaboradores purificaron una enzima de extractos bacterianos a la que incorporaron precursores de DNA marcados con radiactividad en un polímero ácido insoluble de DNA. La enzima se denominó *polimerasa de DNA* (y más tarde, después del descubrimiento de las enzimas que polimerizan DNA, *polimerasa I de DNA*). Para que tuviera lugar la reacción, la enzima requería la presencia de DNA y los cuatro trifosfatos de desoxirribonucleósido (dTTP, dATP, dCTP y dGTP). El DNA recién sintetizado y marcado con radiactividad tenía la misma composición de bases que el DNA original no marcado, lo cual sugería que las cadenas de DNA original habían servido como **moldes** para la reacción de polimerización.

A medida que se descubrieron propiedades adicionales de las polimerasas de DNA se volvió evidente que la replicación era más compleja de lo que se pensaba. Cuando se probaron distintos tipos de DNA molde, se encontró que este DNA molde tenía que poseer ciertas características estructurales para promover la incorporación de precursores marcados (fig. 13-7). Por ejemplo, en una doble cadena intacta de DNA no se estimulaba la incorporación. No sorprendió considerar que la doble hélice debe separarse para que suceda la replicación. Era menos obvio por qué una cadena sencilla de una molécula circular también

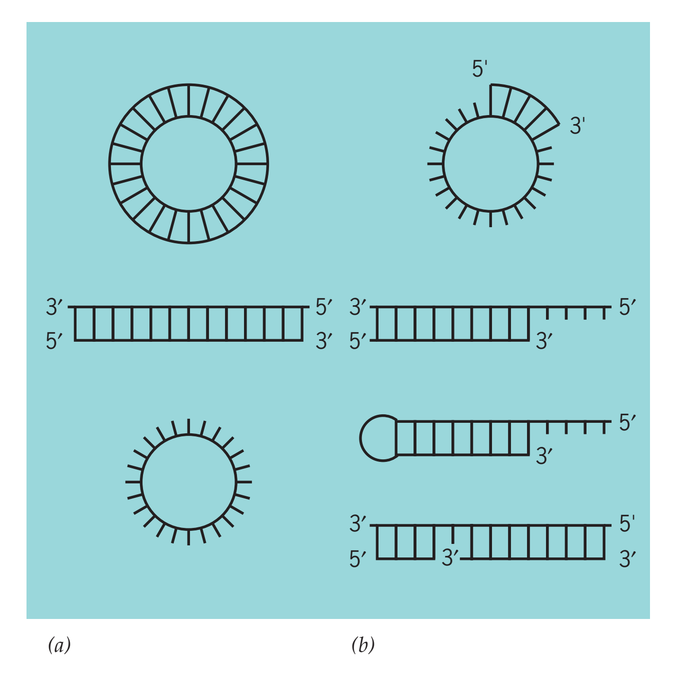


FIGURA 13-7 Moldes y estructuras que no sirven como tales para la actividad de las polimerasas de DNA. *a*) Ejemplos de estructuras de DNA que no estimulan la síntesis de DNA in vitro y la polimerasa de DNA aislada de *E. coli*. *b*) Ejemplos de estructuras de DNA que estimulan la síntesis de DNA in vitro. En todos los casos, las moléculas en *b* contienen una cadena molde para copiar y una cadena iniciadora con un 3′ OH al cual se agregan los nucleótidos.

era incapaz de estimular la actividad de polimerización; se esperaría que esta estructura fuera el molde ideal para dirigir la síntesis de una cadena complementaria. En cambio, cuando se probó con una molécula de DNA de doble cadena parcial, la mezcla de reacción generó una incorporación inmediata de nucleótidos.

Pronto se descubrió que una cadena sencilla de DNA circular no servía como molde para la polimerasa de DNA debido a que la enzima no puede *iniciar* la formación de una cadena de DNA. Más bien, ésta sólo puede agregar nucleótidos en el extremo hidroxilo 3′ terminal de una cadena preexistente. La cadena que provee el OH 3′ terminal se denomina **iniciador**. Todas las polimerasas de DNA (de procariotas y eucariotas) tienen estos dos requerimientos básicos (fig. 13-8*a*): una cadena de DNA molde para copiar y una cadena iniciadora en la cual los nucleótidos pueden agregarse. Estos requerimientos explican por qué ciertas estructuras de DNA no pudieron promover la síntesis de DNA (fig. 13-7*a*). Una doble hélice lineal intacta provee el extremo hidroxilo 3′ terminal pero no tiene el molde. Por otra parte, una cadena sencilla circular provee un DNA molde pero carece del iniciador. La molécula de doble cadena parcial (fig. 13-7*b*) satisface ambos requerimientos y promueve la incorporación de nucleótidos. El hallazgo de que la polimerasa de DNA no puede iniciar la síntesis de una cadena de DNA generaba una pregunta crucial: ¿de qué manera la síntesis de una nueva cadena se inicia en la célula? Se retoma esta pregunta más adelante.

La polimerasa de DNA que purificó Kornberg fue difícil de entender en términos de su presumible papel como enzima replicante: ésta sólo sintetizaba DNA en la dirección 5′ a 3′ (escrito como 5′ → 3′). El diagrama que presentaron Watson y Crick (véase fig. 13-1) mostraba sucesos como ellos *esperaban* que ocurrieran en la horquilla de replicación. El diagrama sugería que una de las cadenas nuevamente sintetizadas se polimerizaba en la dirección 5′ → 3′, mientras que la otra cadena lo hacía en la dirección 3′ → 5′. ¿Acaso había otras enzimas encargadas de la construcción de la cadena en la dirección 3′ → 5′?, ¿la enzima trabajaba en condiciones diferentes en la célula que bajo condiciones in vitro? Más adelante se analiza esta pregunta.

Durante el decenio de 1960 hubo indicios de que la "enzima de Kornberg" no era la única polimerasa de DNA en una célula bacteriana. Entonces, en 1969, se aisló una cepa mutante de *E. coli* y se observó que tenía menos de 1% de la actividad normal de la enzima, pero era capaz de multiplicarse a una tasa normal. Estudios posteriores revelaron que la enzima de Kornberg, o *polimerasa de DNA I*, era sólo una de las distintas polimerasas de DNA presentes en las células bacterianas; la principal enzima responsable de la replicación del DNA es la *DNA polimerasa III*. Una célula bacteriana típica contiene 300 a 400 moléculas de polimerasa de DNA I, pero sólo unas 10 copias de la polimerasa de DNA III. Las cantidades mucho mayores de la polimerasa de DNA I en la célula han minimizado la presencia de la polimerasa de DNA III. Sin embargo, el descubrimiento de las otras polimerasas de DNA no resolvía las dos preguntas básicas mencionadas; ninguna de estas enzimas puede iniciar las cadenas de DNA ni construir cadenas en la dirección 3′ → 5′.

Replicación semidiscontinua La ausencia de actividad de polimerización en la dirección 3′ → 5′ tiene una explicación más directa: no se pueden sintetizar cadenas de DNA en dicha dirección. Ambas cadenas recién sintetizadas se ensamblan en la dirección 5′ → 3′. Durante la reacción de polimerización, el grupo —OH en el extremo 3′ del iniciador lleva a cabo un ataque nucleofílico en el fosfato alfa 5′ del trifosfato de nucleósido que entra, como se muestra en la figura 13-8*b*. Las moléculas de la polimerasa encargadas de la construcción de las dos cadenas de DNA se mueven en una dirección 3′ a 5′ *a lo largo del molde* y ambas construyen una cadena que crece desde su extremo 5′ fosfato terminal (fig. 13-8*c*). Por consecuencia, una de las cadenas resintetizadas crece en dirección del asa de replicación donde las cadenas de DNA parental se separan, mientras la otra cadena crece y se aleja de la horquilla.

Aunque esto resuelve el problema en relación con una enzima que sólo puede sintetizar una cadena en una dirección, genera un dilema aún más difícil. Es evidente que la cadena que crece hacia la horquilla en la figura 13-8*c* se puede construir mediante adición continua de nucleótidos a su extremo 3′. ¿Pero cómo se sintetiza la otra cadena? Pronto se obtuvo evidencia de que la cadena que crece y se aleja de la horquilla de replicación se sintetizaba *de manera discontinua*, esto es, en fragmentos (fig. 13-9). Antes de que la síntesis de un fragmento pueda iniciarse, se debe exponer un tramo adecuado del DNA molde para el desplazamiento de la horquilla de replicación. Una vez iniciada ésta, cada fragmento crece y se aleja de la horquilla de replicación hacia el extremo 5′ de un fragmento previamente formado al cual se une con posterioridad. Por lo tanto, las dos cadenas hijas se sintetizan por procesos muy diferentes. La cadena que se sintetiza de modo continuo se conoce como **cadena adelantada**

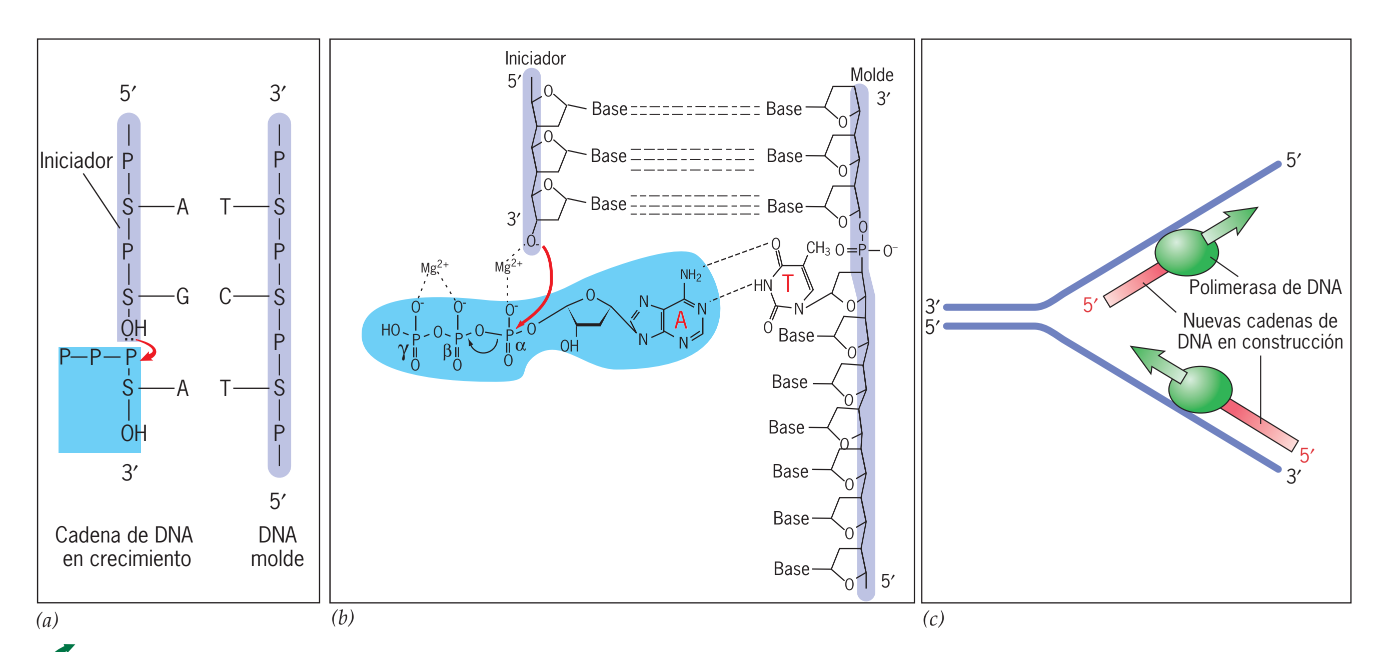


FIGURA 13.8 Incorporación de nucleótidos en el extremo 3′ de una cadena en formación por medio de una polimerasa de DNA. *a*) Polimerización de un nucleótido en el extremo 3′ terminal de una cadena iniciadora. La enzima selecciona nucleótidos para la incorporación basada en su capacidad para formar pares en los nucleótidos de la cadena molde. *b*) Modelo simplificado del mecanismo de dos iones metálicos para la reacción en la cual los nucleótidos se incorporan a una cadena de DNA que crece por medio de una polimerasa de DNA. En este modelo, uno de los iones de magnesio empuja al protón hacia afuera del grupo hidroxilo 3′ del nucleótido terminal del iniciador, lo cual facilita el ataque nucleofílico del átomo de oxígeno 3′ de carga negativa en el fosfato alfa del trifosfato de nucleósido entrante. El segundo ion de magnesio promueve la liberación del pirofosfato. Los dos iones metálicos se unen a la enzima mediante residuos de ácido aspártico muy conservados en el sitio activo. *c*) Diagrama esquemático que muestra la dirección del movimiento de la polimerasa a lo largo de las dos cadenas molde.

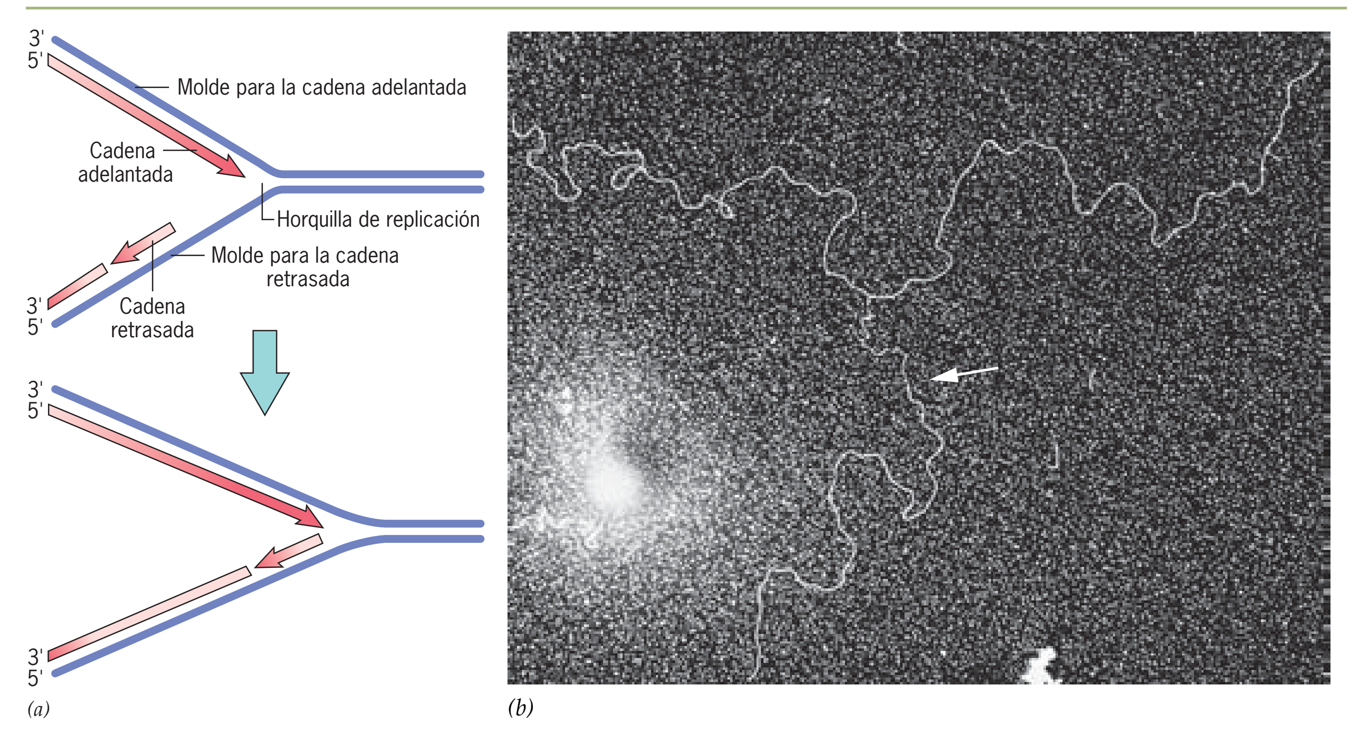


FIGURA 13.9 Una secuencia diferente de sucesos sintetiza a las dos cadenas de una doble hélice. Las moléculas de la polimerasa de DNA se mueven a lo largo de un molde sólo en dirección 3′ → 5′. Como resultado, las dos cadenas recién ensambladas crecen en direcciones opuestas, una hacia la horquilla de replicación y la otra en el sentido contrario. Una cadena se ensambla en forma continua y la otra como fragmentos unidos de manera enzimática. *a*) Diagrama esquemático que muestra las diferencias en las síntesis de las dos cadenas. *b*) Micrografía electrónica de una molécula de DNA de bacteriófago en replicación. Los dos extremos de la izquierda son los dúplex en replicación y el extremo de la derecha es el dúplex no replicado. La cadena retrasada del DNA replicado de novo contiene una porción de cadena sencilla expuesta (o más delgada) que discurre desde la horquilla de replicación que muestra la flecha. (*B*, TOMADA DE J. WOLFSON Y DAVID DRESSLER, REPRODUCIDA CON AUTORIZACIÓN DE ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY, VOL. 29; © 1975, POR ANNUAL REVIEWS, INC.)

debido a que lo hace conforme avanza la horquilla de replicación. La cadena que se sintetiza de forma discontinua se llama **cadena retrasada** dado que el inicio de cada fragmento debe esperar a que las cadenas progenitoras se separen y expongan un fragmento (fig. 13-9). Como se discute en la página 552, ambas cadenas se sintetizan con probabilidad de manera simultánea, así que los términos *adelantada* y *retrasada* no pueden ser apropiados como se pensaba al principio. En virtud de que una cadena se sintetiza de modo continuo y la otra de manera discontinua, la replicación es *semidiscontinua.*

El descubrimiento de que una cadena se sintetiza primero como un pequeño fragmento lo realizó Reiji Okazaki de la *Universidad de Nagoya* en Japón, después de varios experimentos de marcaje. Okazaki encontró que en bacterias incubadas con timidina [^{3}H] por pocos segundos e inmediatamente cosechadas, la mayor parte de la reactividad podría encontrarse como parte de fragmentos pequeños de DNA de unos 1 000 a 2 000 nucleótidos de longitud. En cambio, si las células se incubaban con el DNA marcado precursor por un minuto o dos, casi toda la radiactividad incorporada formó parte de moléculas de DNA mucho más grandes (fig. 13-10). Estos resultados indicaron que una porción del DNA se construyó en pequeños segmentos (más tarde conocidos como fragmentos de Okazaki) que se ligaron con rapidez a piezas mucho más grandes sintetizadas con anterioridad. La enzima que une los **fragmentos de Okazaki** en una cadena continua se conoce como **ligasa de DNA**.

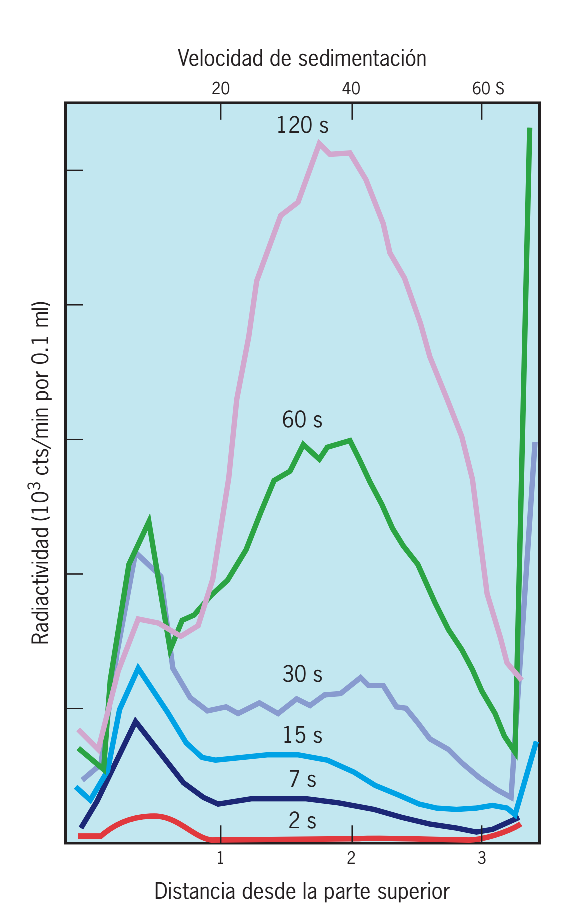


FIGURA 13-10 Resultados de un experimento que muestran que parte del DNA se sintetiza en fragmentos pequeños. Perfiles del gradiente de densidad de sacarosa del DNA de un cultivo de células de *E. coli* infectadas con fago. Las células se marcaron en diferentes tiempos y se determinó la velocidad de sedimentación del DNA marcado. Cuando el DNA se preparó después de pulsos muy cortos, un porcentaje significativo de radiactividad apareció en fragmentos muy cortos de DNA (representado por el pico cercano a la parte superior del tubo a la izquierda). Después de periodos de 60 a 120 s, la altura relativa de este pico descendió a medida que los fragmentos marcados de DNA se unieron a los extremos de las moléculas de elevado peso molecular. (Tomada de R. Okazaki et al., Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 33:130, 1968.)

El descubrimiento de que la cadena retrasada se sintetiza en piezas suscitó una nueva pregunta acerca del inicio de la síntesis del DNA. ¿De qué manera la síntesis de cada uno de estos fragmentos comienza cuando ninguna de las polimerasas de DNA es capaz de iniciar la cadena? Estudios posteriores revelaron que el inicio no lo lleva a cabo una polimerasa de DNA sino más bien un tipo distinto de polimerasa de RNA, la denominada **primasa**, que sintetiza una secuencia corta de RNA, no de DNA. La secuencia adelantada, cuya síntesis comienza en el origen de la replicación, también la inicia una molécula de primasa. El fragmento corto de RNA lo sintetiza una primasa en el extremo 5′ de la cadena adelantada y el extremo 5′ de cada fragmento de Okazaki que sirve como el iniciador que se requiere para la síntesis de DNA por medio de una polimerasa de DNA. Los iniciadores de RNA se eliminan después y los espacios resultantes en la cadena se llenan y entonces se ligan por medio de una ligasa de DNA. Estos sucesos se ilustran de manera esquemática en la figura 13-11. La formación de iniciadores transitorios de RNA durante el proceso de replicación del DNA es una actividad compleja. Quizá sea mayor la probabilidad de cometer errores durante el inicio que durante el alargamiento; por lo tanto, el empleo de un segmento de RNA corto que puede degradarse elimina la inclusión de bases erróneas.

La maquinaria que opera en la horquilla de replicación

La replicación supone más que la incorporación de nucleótidos. El desenrollamiento del dúplex y la separación de las cadenas requiere la ayuda de dos tipos de proteínas que se unen al DNA, una **helicasa** (o enzima que desenrolla al DNA) y **proteínas que se unen al DNA de cadena sencilla** (**SSB**). Las helicasas de DNA desenrollan al dúplex del DNA en una reacción que utiliza energía liberada a partir de la hidrólisis del ATP para separar los puentes de hidrógeno que mantienen juntas a las dos cadenas, lo cual expone a los moldes de DNA de cadena sencilla. *E. coli* tiene por lo menos 12 distintas helicasas, que usa en diferentes aspectos del metabolismo del DNA (y RNA). Una de estas helicasas (el producto del gen *dnaB*) sirve como la máquina principal de desenrollamiento durante la replicación. La helicasa DnaB consiste en seis subunidades estructuradas que forman una proteína semejante a un anillo que encierra a una sola cadena de DNA (fig. 13-12*a*). La helicasa DnaB se coloca primero sobre el DNA en el origen de replicación (con la ayuda de la proteína DnaC) que se desplaza en una dirección 5′ → 3′ a lo largo del molde de la cadena retrasada, lo que desenrolla la hélice durante este proceso (fig. 13-12). En la página 542 se muestra un modelo de una helicasa similar de bacteriófago que incluye la separación de las cadenas durante la replicación. El desenrollamiento del DNA por la helicasa se mantiene por la unión de las proteínas SSB a las cadenas separadas de DNA (fig. 13-12). Estas proteínas que unen de manera selectiva a las

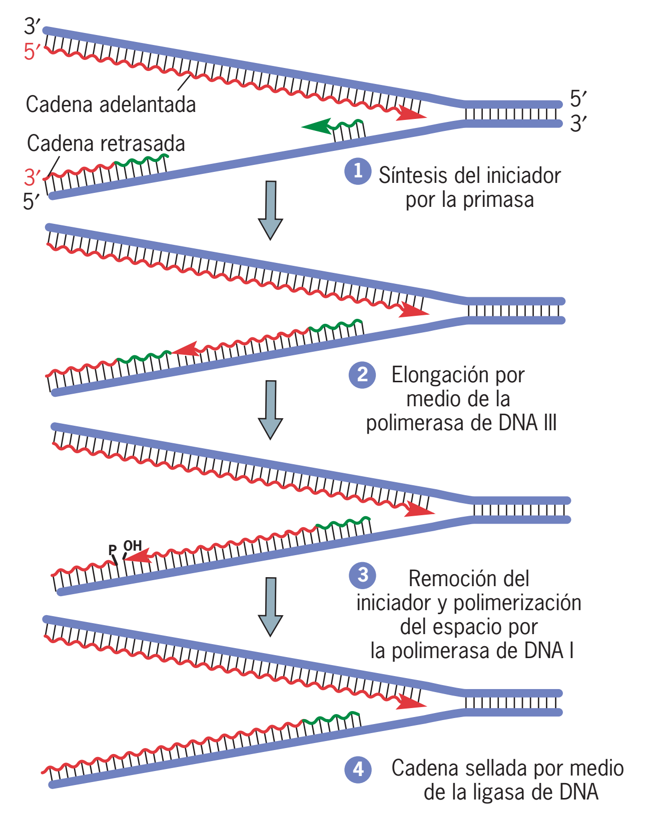


FIGURA 13-11 Uso de fragmentos cortos de RNA como iniciadores removibles para iniciar la síntesis de cada fragmento de Okazaki de la cadena retrasada. Los pasos principales se indican en la figura y se describen en el texto. En las figuras siguientes se señala la función de las diferentes proteínas accesorias que intervienen en estas actividades.

cadenas sencillas de DNA conservan en forma extendida a éstas y previenen que se vuelvan a enrollar o se dañen. Un esquema de la acción combinada de las helicasas de DNA y las proteínas SSB sobre la estructura del DNA de doble hélice se ilustra en la micrografía electrónica de la figura 13-12*b*.

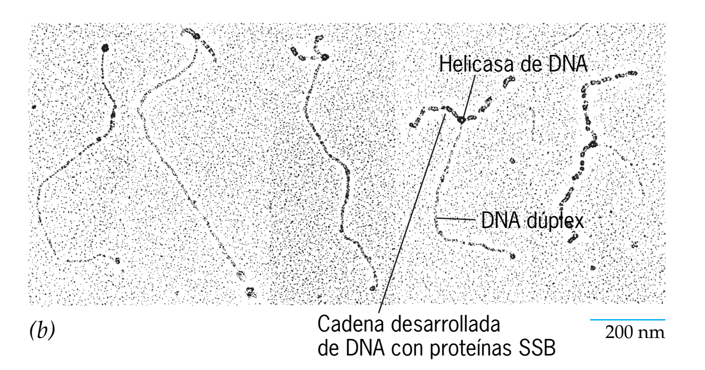
Hay que recordar que una enzima llamada primasa inicia la síntesis de cada fragmento de Okazaki. En las bacterias, la primasa y la helicasa se relacionan de manera transitoria para formar lo que se llama un "primosoma". De los dos miembros del primosoma, la helicasa se mueve a lo largo del molde de la cadena retrasada de manera procesiva (esto es, sin separarse de la plantilla de la cadena durante el tiempo que dura la horquilla de la replicación). Conforme la helicasa "viaja" a lo largo del molde de la cadena retrasada y abre las cadenas del dúplex, la primasa se une de manera periódica a la helicasa y sintetiza los iniciadores cortos de RNA que comienzan la formación de cada fragmento de Okazaki. Como se dijo antes, los iniciadores de RNA se polimerizan después como DNA por medio de una polimerasa de DNA, de modo específico la polimerasa de DNA III.

La evidencia sugiere que la misma polimerasa de DNA III sintetiza fragmentos sucesivos de la cadena retrasada. Para llevar a cabo esto, la molécula de polimerasa III se recicla del sitio donde ha terminado un fragmento de Okazaki y pasa al próximo sitio a lo largo de la cadena retrasada muy cerca del lugar donde se desenrolla el DNA. Una vez en su nuevo sitio, la polimerasa se une al extremo 3′ OH del iniciador de RNA que se ha colocado por delante de una primasa y comienza a incorporar desoxirribonucleótidos en el extremo del RNA corto.

¿De qué forma una polimerasa III se mueve de un sitio de la cadena retrasada a otro sitio cercano a la horquilla de replicación? Se cree que la enzima logra esto al "aprovechar el viaje" con el mecanismo de duplicación de la plantilla de la cadena adelantada que se desplaza en esa dirección. Aunque las dos polimerasas se mueven en direcciones opuestas a lo largo de sus respectivas cadenas, pueden actuar como si fueran parte del mismo complejo de proteínas (fig. 13-13). Las dos polimerasas pueden replicar ambas cadenas al formar un asa en el DNA de la cadena retrasada sobre sí misma, lo que causa que este molde tenga la misma orientación que la cadena adelantada. Las dos polimerasas pueden moverse juntas como parte de un solo complejo de replicación, sin violar la "regla 5′ → 3′" para la síntesis

Primasa
Helicasa de DNA
3′
5′
5′
Cadena retrasada
Iniciador de RNA
Movimiento de helicasa
Cadena adelantada
Proteínas de unión del DNA de cadena sencilla (SSB)
3′

(a)



(b)

FIGURA 13-12 Funciones de la helicasa de DNA, las proteínas de unión al DNA de cadena sencilla y la primasa en la horquilla de replicación. *a*) La helicasa se mueve a lo largo del DNA y cataliza el desenrollamiento del ATP del dúplex. Conforme el DNA se desenrolla, las cadenas evitan la formación del dúplex por medio de proteínas de unión del DNA de cadena sencilla (SSB). La primasa relacionada con la helicasa sintetiza los iniciadores de RNA, es decir, cada uno de los fragmentos de Okazaki. Los iniciadores de RNA, que tienen un tamaño aproximado de 10 nucleótidos, se remueven con posterioridad. *b*) Serie de cinco micrografías electrónicas que muestran moléculas de DNA incubadas con una helicasa de DNA vírico (antígeno T, pág. 558) y proteínas SSB de *E. coli*. Las moléculas de DNA se desenrollan de forma progresiva de izquierda a derecha. La helicasa aparece en la partícula circular en la horquilla y las proteínas SSB están unidas a los extremos de cadena sencilla, lo que hace parecer a éstas como cuentas de un collar. (*B*, TOMADA DE RAINER WESSEL, JOHANNES SCHWEIZER Y HANS STAHL, J VIROL 66:807, 1992; © 1992 AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY.)

de una cadena de DNA (fig. 13-13). Una vez que las polimerasas ensamblan la cadena retrasada alcanzan el extremo 5′ del fragmento de Okazaki sintetizado durante la vuelta previa, la plantilla de la cadena retrasada se libera al parecer y la polimerasa comienza a trabajar en el extremo 3′ del próximo iniciador de RNA hacia la horquilla de replicación. Este modelo que se muestra en la figura 13-13 se refiere a menudo como el "modelo del trombón" debido a que el asa de DNA crece de manera repetida y se acorta durante la replicación de la cadena retrasada, lo que semeja el movimiento del "asa" de un trombón.

Estructura y funciones de las polimerasas de DNA

La enzima que sintetiza las cadenas de DNA durante la replicación en *E. coli* es la *polimerasa de DNA III*, la cual es parte de una "maquinaria de replicación" llamada *holoenzima polimerasa de DNA III* o *replisoma* (fig. 13-14). Uno de los componentes no catalíticos del replisoma, denominado **pinza beta**, mantiene la polimerasa relacionada con el molde de DNA. Las polimerasas de DNA (como las polimerasas de RNA) poseen dos propiedades contrastantes: a) tienen que permanecer vinculadas con la plantilla sobre largos tramos para sintetizar una cadena complementaria continua y b) no se pueden fijar con tanta fuerza que les impida desplazarse de un nucleótido al siguiente. Estas propiedades contrastantes se deben a la forma de dona de la pinza beta que rodea al DNA (fig. 13-15*a*) y se desliza de manera libre a lo largo de éste. A medida que la polimerasa de DNA se une a una "pinza de deslizamiento" tipo beta, se puede mover progresivamente de un nucleótido al próximo sin pasarse más allá del molde. La polimerasa en la cadena adelantada permanece unida a una sola pinza de tipo beta durante la replicación. En

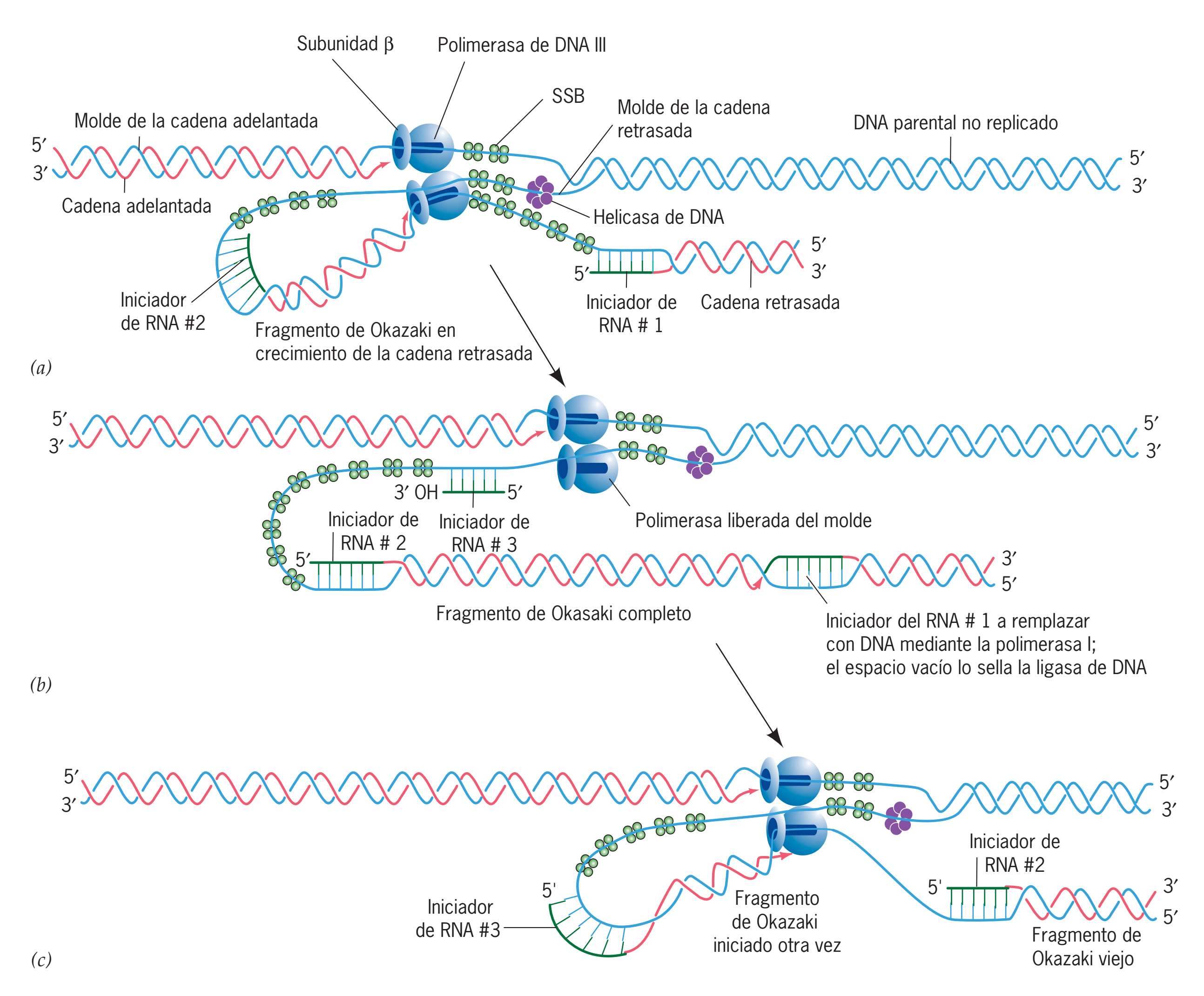


FIGURA 13-13 Dos polimerasas de DNA que trabajan de manera conjunta como parte de un complejo único llevan a cabo la replicación de las cadenas adelantada y retrasada en *E. coli*. *a*) Las dos moléculas de la polimerasa de DNA III discurren juntas y de esa forma se desplazan hacia el extremo opuesto de sus moldes respectivos. Esto sucede porque una de las cadenas del molde de la cadena retrasada forma un asa. *b*) La polimerasa libera el molde de la cadena retrasada cuando encuentra al fragmento de Okazaki ya sintetizado. *c*) La polimerasa que participó en el ensamble de los fragmentos previos de Okazaki se une ahora otra vez al DNA molde de la cadena retrasada por delante del DNA sometido a síntesis en el extremo del iniciador #3 del RNA construido por la primasa. (TOMADA DE D. VOET Y J. G. VOET, BIOCHEMISTRY, 2ND ED; © 1995, JOHN WILEY AND SONS, INC. REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE JOHN WILEY AND SONS, INC.)

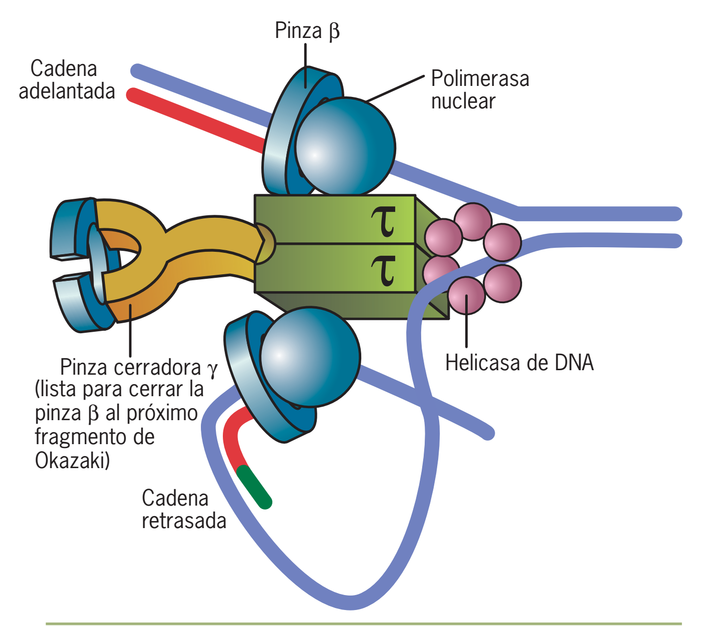
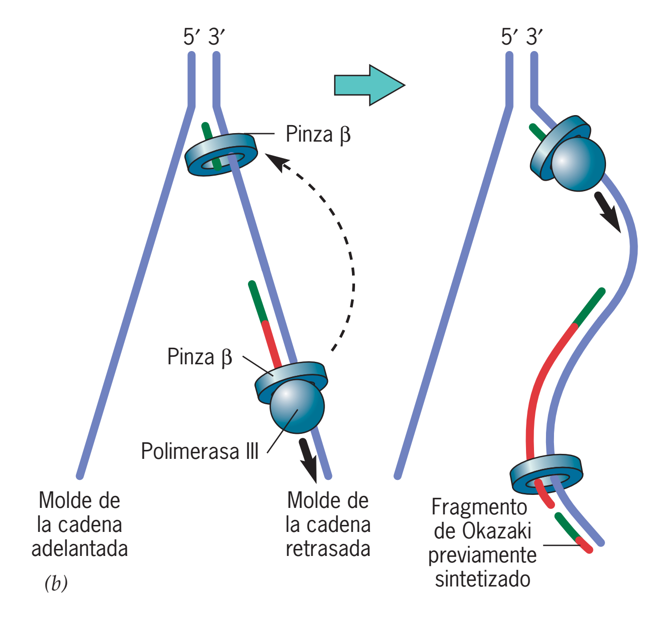
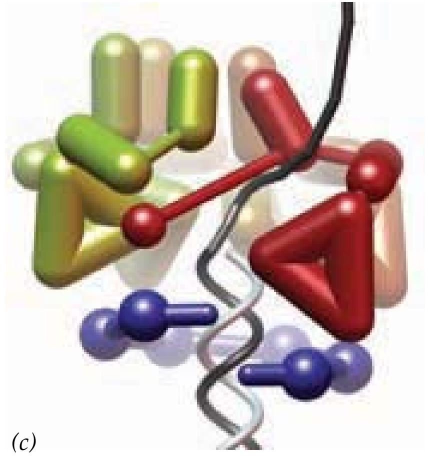


FIGURA 13-14 Representación esquemática de la holoenzima polimerasa de DNA III (replisoma). El replisoma contiene 10 distintas subunidades organizadas en diferentes componentes. Partes del replisoma son: a) dos polimerasas nucleares que replican al DNA, b) dos subunidades τ que mantienen a las polimerasas unidas en el complejo además de unir la helicasa (no considerada parte del replisoma), c) dos o más pinzas beta que permiten a la polimerasa relacionarse con el DNA y d) un complejo de pinza (gamma) encargado de cerrar cada una de las pinzas deslizantes en el DNA. (A PARTIR DE REPRESENTACIONES DE M. O'DONNELL.)

(a)



(b)



(c)

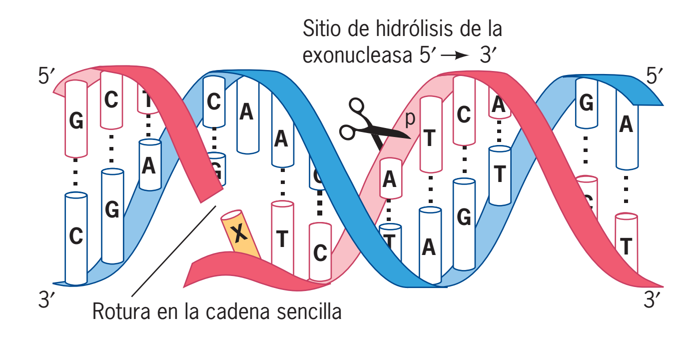
FIGURA 13-15 Pinza deslizante β y cargador de pinza. *a*) Modelo de espacio lleno que muestra las dos subunidades que integran la estructura en forma de rosquilla de la pinza deslizante β de *E. coli*. *b*) Diagrama esquemático de la polimerasa que circula por la cadena seguidora. La polimerasa es mantenida en contacto con el DNA por la pinza deslizante β conforme ésta se mueve a lo largo de la cadena utilizada como plantilla, y sintetiza la cadena complementaria. Después de la terminación del fragmento de Okazaki, la enzima se desprende de su pinza β y circula hacia una pinza recién ensamblada que "espera" en una unión del iniciador de RNA-molde de DNA corriente arriba. La pinza β original es dejada atrás por un tiempo en el fragmento de Okazaki terminado, pero luego se desensambla y reutiliza. *c*) Modelo de un complejo de pinza deslizante y cargador de pinza de un procariota arquea con base en el análisis de imágenes de microscopia electrónica. El cargador de pinza (mostrado con subunidades en rojo y en verde) se une a la pinza deslizante (azul), que se mantiene en una conformación en espiral abierta parecida a una rondana de presión. El DNA se ha abierto paso a través del hueco en la pinza. La cadena iniciadora del DNA termina dentro del cargador de pinza, mientras que la cadena que sirve de plantilla se extiende a través de una abertura en la parte superior de la proteína. El cargador de pinza ha sido descrito como un "tapón con rosca" que se acopla en el DNA de tal modo que los subdominios de la proteína forman una espiral la cual puede "enroscarse" en el esqueleto de DNA helicoidal. (*A*, TOMADA DE JOHN KURIYAN, CELL, 69:427, 1992, © CELL PRESS. *B*, TOMADA DE P. T. STUKENBERG, J. TURNER AND M. O'DONNELL, CELL 78:878, 1994; CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS; *C* TOMADA DE T. MIYATA, ET AL., PROC. NAT'L. ACAD. SCI. U.S.A. 102:13799, 2005, CORTESÍA DE K. MORIKAWA.)

cambio, cuando la polimerasa en la cadena retrasada completa la síntesis de un fragmento de Okazaki, ésta se desengancha de la pinza beta y otra vez se une a una pinza beta, la cual se halla ensamblada a la unión entre el iniciador del RNA y el DNA molde localizado muy cerca de la horquilla de replicación (fig. 13-15*b*). Pero, ¿cómo es que una molécula de DNA con gran elongación entra en una pinza en forma de anillo como en la figura 13-15*a*? El ensamblaje de la pinza β alrededor del DNA requiere un *cargador de pinza* multisubunitario que también es parte del replisoma (figs. 13-14 y 13-15*c*). En el estado unido a ATP, el cargador de pinza se une a una unión iniciador-plantilla al tiempo que mantiene la pinza β en una conformación abierta como se ilustra en la figura 13-15*c*. Una vez que el DNA ha pasado a través de la abertura en la pared de la pinza, el ATP unido al cargador de pinza se hidroliza, con lo que se libera de la pinza; entonces ésta se cierra alrededor del DNA.

La polimerasa de DNA I, que consiste sólo en una subunidad, interviene de manera primaria en la reparación del DNA, proceso por el cual las secciones dañadas del DNA se corrigen (pág. 562). La polimerasa de DNA I también elimina los iniciadores de RNA en el extremo 5′ terminal de cada fragmento de Okazaki durante la replicación y remplaza a éstos con DNA. La capacidad de la enzima para llevar a cabo esta tarea se discute en la siguiente sección.

Actividades de la exonucleasa de las polimerasas de DNA Ahora que se han explicado las diferentes propiedades desconcertantes de la polimerasa de DNA I, como la incapacidad de la enzima para iniciar la síntesis de una cadena, se mencionan otras observaciones curiosas. Kornberg encontró que las preparaciones de la polimerasa de DNA I siempre contienen actividades de exonucleasa, es decir, son capaces de degradar polímeros de DNA al eliminar uno o más nucleótidos del extremo de la molécula. Al principio, Kornberg asumió que esta actividad se debía a la contaminación con enzima porque la acción de las exonucleasas es contraria a la capacidad de síntesis de DNA. No obstante, la actividad de exonucleasa no pudo eliminarse de las preparaciones de polimerasa y de hecho es una actividad real de la molécula de la polimerasa. Con posterioridad se mostró que todas las polimerasas bacterianas poseen la actividad de exonucleasa. Las exonucleasas pueden dividirse en actividades de exonucleasa 5′ → 3′ y 3′ → 5′, según la dirección en la cual se degrada la cadena. La polimerasa de DNA I tiene ambas actividades de exonucleasa, 3′ → 5′ y 5′ → 3′, además de su actividad de polimerización (fig. 13-16). Estas tres actividades se localizaron en diferentes dominios de un solo polipéptido. De esta forma, la polimerasa de DNA I posee tres enzimas en una. Las dos actividades de exonucleasa tienen funciones por entero diferentes en la replicación. Primero se describe la actividad de exonucleasa 5′ → 3′.

Casi todas las nucleasas son específicas para DNA o RNA, pero la exonucleasa 5′ → 3′ de la polimerasa de DNA I puede degradar los dos tipos de ácido nucleico. El inicio de los fragmentos de Okazaki por medio de la primasa deja un segmento de RNA en el extremo 5′ de cada fragmento (véase el iniciador de RNA 1 de la figura 13-13*b*), el cual se remueve por la actividad de exonucleasa 5′ → 3′ de la polimerasa de DNA I (fig. 13-16*a*). A medida que la enzima remueve los ribonucleótidos del iniciador, su actividad de polimerasa rellena de manera simultánea el espacio resultante con desoxirribonucleótidos. El



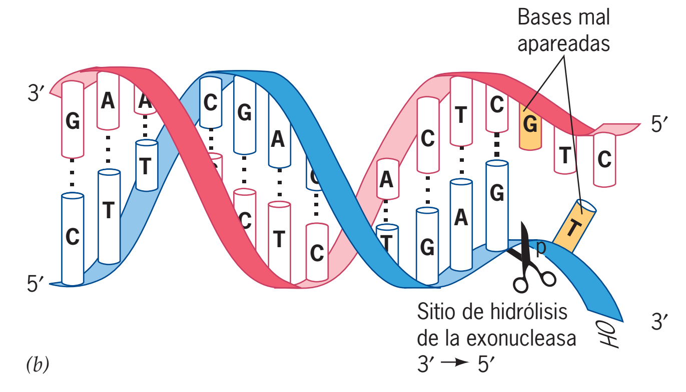


FIGURA 13-16 Las actividades de exonucleasa de la polimerasa de DNA I. *a*) La función de exonucleasa 5′ → 3′ remueve los nucleótidos desde el extremo 5′ de una cadena sencilla con rotura. Esta actividad tiene una función clave para remover los iniciadores de RNA. *b*) La función de exonucleasa 3′ → 5′ desplaza los nucleótidos mal apareados del extremo 3′ de la cadena en crecimiento del DNA. Esta actividad tiene una función clave en el mantenimiento de la precisión de la síntesis de DNA. (TOMADA DE D. VOET Y J. G. VOET, BIOCHEMISTRY, 2ND ED; © 1995, JOHN WILEY AND SONS, INC. REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE JOHN WILEY AND SONS, INC.)

último desoxirribonucleótido incorporado se liga de manera covalente al extremo 5′ terminal del fragmento de DNA antes sintetizado por medio de una ligasa de ácido desoxirribonucleico. La función de la exonucleasa 3′ → 5′ se revisa en la siguiente sección.

Garantizar la alta fidelidad durante la replicación del DNA La supervivencia de un organismo depende de la duplicación precisa de su genoma. Un error en la síntesis de la molécula del RNA mensajero por una polimerasa de RNA genera la síntesis de una proteína defectuosa, pero una molécula de RNA es sólo un molde de vida corta entre una gran población de estas moléculas; por lo tanto, un error en una de éstas es insignificante. En cambio, un error durante la replicación del DNA crea una mutación permanente y la posible eliminación de la progenie celular. En *E. coli*, la probabilidad de que un nucleótido incorrecto se incorpore en el DNA durante la replicación y permanezca allí es menor de 10^{-9} o tan baja como una en mil millones de nucleótidos. Dado que el genoma de *E. coli* contiene alrededor de 4×10^6 pares de nucleótidos, esta frecuencia de error corresponde a tan poco como una alteración nucleotídica por cada 100 ciclos de

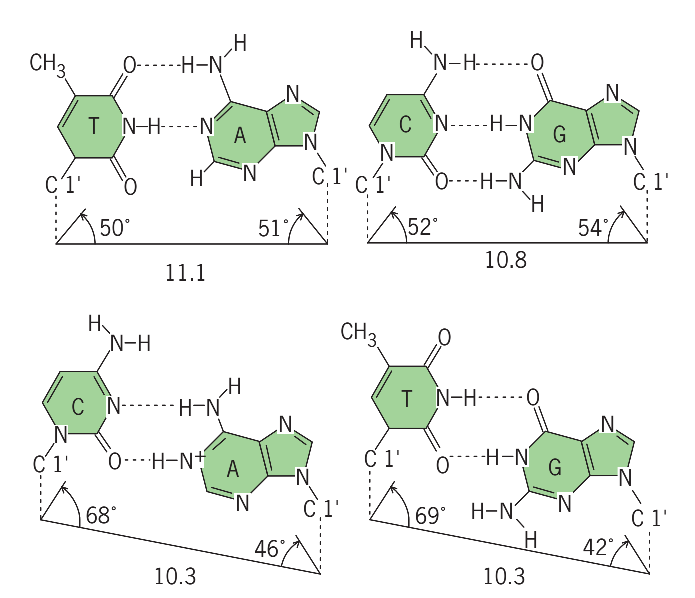
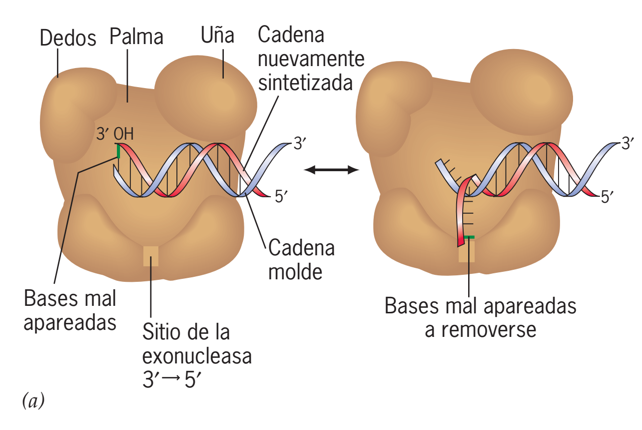
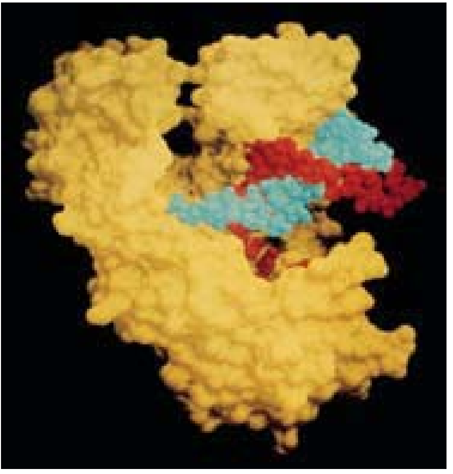


FIGURA 13-17 **Geometría del apareamiento de bases apropiado y erróneo.** (Tomada de H. Echols y M. F. Goodman, reproducida con autorización de The Annual Review of Biochemistry, vol 60; © 1991, Annual Reviews Inc.)





(b)

FIGURA 13-18 **Activación de la exonucleasa 3′ → 5′ de la polimerasa de DNA I.** *a*) Modelo esquemático de una porción de la polimerasa de DNA I conocido como fragmento de Klenow, el cual contiene las actividades de polimerasa y exonucleasa 3′ → 5′. La actividad de exonucleasa 5′ → 3′ se localiza en una porción diferente del polipéptido, que no se muestra aquí. Se refiere a menudo que las regiones del fragmento de Klenow son semejantes a la forma de una mano derecha parcialmente abierta y de ahí que las porciones se designen como “dedos”, “palma” y “uña”. Los sitios catalíticos de la polimerización se hallan en el subdominio de la “palma”. El extremo 3′ terminal de la cadena creciente puede proyectarse entre la polimerasa y el sitio activo de la exonucleasa. La adición de bases erróneas del extremo de la cadena en crecimiento produce una cadena sencilla libre 3′ terminal que entra al sitio de exonucleasa, donde se remueve. (Los sitios de la polimerasa y exonucleasa de la polimerasa III operan de manera similar pero se encuentran en diferentes subunidades.) *b*) Modelo molecular del fragmento de Klenow que forma un complejo con el DNA. La cadena de DNA molde que se copia aparece en azul y en rojo la cadena iniciadora en la cual los nucleótidos próximos deben agregarse. (*A*, tomada de T. A. Baker y S. P. Bell, Cell 92:296, 1998; según la representación de C. M. Joyce y T. A. Steitz, con autorización de Cell Press; *B*, cortesía de Thomas A. Steitz.)

replicación. Esto representa la *velocidad de mutación espontánea* en esta bacteria. Se piensa que los seres humanos tienen una frecuencia de mutación espontánea similar para la replicación de las secuencias que codifican proteínas.

La incorporación de un nucleótido en particular en el extremo de una cadena naciente depende de que el trifosfato de nucleósido entrante pueda formar una complementación correcta con el nucleótido de la cadena molde (véase fig. 13-8*b*). Los análisis de las distancias entre los átomos y ángulos de enlace indican que el apareamiento de bases A-T y G-C tienen una geometría muy parecida (esto es, tamaño y forma). Cualquier desviación de estos apareamientos resulta en una geometría diferente, como se muestra en la figura 13-17. En cada sitio a lo largo del molde, la polimerasa de DNA debe discriminar entre los cuatro diferentes precursores potenciales conforme se mueven dentro y fuera del sitio activo de la enzima. Entre los cuatro posibles trifosfatos de nucleósido que pueden entrar, sólo uno con una geometría apropiada puede encajar perfectamente con el DNA molde y ello produce un apareamiento de bases A-T o G-C que puede llenar el sitio activo de la enzima. Este es sólo el primer paso en el proceso de discriminación. Si la enzima “percibe” el nucleótido entrante como correcto se observa un cambio conformacional en el cual el “dedo” de la polimerasa gira hacia la “palma” (fig. 13-18*a*), con lo cual evita que el nucleótido entrante se una. Este es un ejemplo de cómo un apareamiento erróneo puede inducir un cambio, como se discute en la página 100. Si el apareamiento de bases recién formado presenta una geometría inadecuada, el sitio activo no puede adquirir la conformación requerida para la catálisis y el nucleótido incorrecto no se incorpora. En cambio, si el apareamiento de bases presenta una geometría adecuada, el nucleótido entrante se une de manera covalente al extremo de la cadena que se encuentra en crecimiento.

En ocasiones, la polimerasa incorpora un nucleótido incorrecto, lo que significa un apareamiento de bases diferente de

A-T o G-C. Se estima que un apareamiento incorrecto ocurre de manera aleatoria una vez por cada 10^5 a 10^6 nucleótidos incorporados, una frecuencia que es 10^3 a 10^4 veces mucho más grande que la frecuencia de mutación espontánea próxima a 10^{-9}. ¿Por qué la frecuencia de las mutaciones es tan baja? Parte de la respuesta se encuentra en la segunda de las dos actividades de exonucleasa mencionadas antes, la actividad 3′→ 5′ (fig. 13-16*b*). Cuando un nucleótido incorrecto lo incorpora la polimerasa, el extremo nuevo de la cadena tiene una tendencia aumentada para separarse del molde y formar una cadena sencilla 3′ terminal. Cuando sucede esto, la enzima sufre un cambio conformacional que dirige el extremo de la cadena recién sintetizada al sitio de exonucleasa 3′ → 5′ (fig. 13-18), el cual remueve al nucleótido erróneo. Este trabajo de "lectura y corrección" es uno de los más importantes de todas las actividades enzimáticas e ilustra cómo la maquinaria de las moléculas biológicas ha evolucionado con gran complejidad. La actividad de exonucleasa 3′ → 5′ remueve cerca de 99 de cada 100 bases mal apareadas, lo que incrementa la fidelidad a casi 10^{-7} a 10^{-8}. Además, la bacteria posee un mecanismo llamado reparación del apareamiento erróneo que opera después de la replicación (pág. 564) y corrige casi todas las uniones erróneas que escapan del paso de lectura y corrección. En conjunto, todos estos procesos reducen la frecuencia de error observada en alrededor de 10^{-9}. Así, la fidelidad de la replicación del DNA se basa en tres actividades distintas: 1) selección precisa de los nucleótidos, 2) lectura y corrección inmediata y 3) una reparación del apareamiento erróneo después de la replicación.

Otra característica importante de la replicación en bacterias es la velocidad. La replicación de un cromosoma bacteriano completo en unos 40 min a 37°C exige que cada horquilla de replicación se mueva cerca de 1 000 nucleótidos por segundo, lo cual es equivalente a la longitud de un fragmento de Okazaki completo. De esta forma, el proceso completo de la síntesis del fragmento de Okazaki, incluidos la formación de un iniciador de RNA, la elongación del DNA, la lectura y corrección simultánea por medio de la polimerasa de DNA, la eliminación del RNA, su remplazo con DNA y la ligación de las cadenas, ocurre en alrededor de un segundo. Aunque *E. coli* tarda unos 40 min en replicar su DNA, un nuevo ciclo de replicación puede iniciar antes de que el ciclo previo se complete. Por consecuencia, cuando estas bacterias crecen a su máxima velocidad, duplican su número en alrededor de 20 minutos.

La replicación en las células eucariotas

Como se mencionó en el capítulo 10, los nucleótidos de la secuencia del genoma humano podrían llenar un libro de un millón de páginas de extensión. Mientras que esto representa para cientos de investigadores con el uso de computadoras de alta velocidad varios años para secuenciar el genoma humano, un solo núcleo celular de unos 10 μm de diámetro puede copiar todo el DNA en unas cuantas horas. Dado que las células eucariotas tienen amplios genomas y complejas estructuras de cromosomas, el entendimiento de la replicación en las células eucariotas ha sido lento en comparación con las bacterias. Esta diferencia se ha superado de forma gradual con el desarrollo de sistemas experimentales eucariotas aplicados junto con los utilizados por décadas en el estudio de la replicación en procariotas. Pueden mencionarse los siguientes:

- El aislamiento de mutantes de levaduras incapaces de crear productos de genes específicos requeridos para diferentes aspectos de la replicación.
- El análisis de la estructura y el mecanismo de acción de las proteínas de duplicación de especies de arqueas (como en la figura 13-15*c*). En estos procariotas la duplicación requiere de proteínas homólogas a las de las células eucariotas pero menos complejas y más fáciles de estudiar.
- El desarrollo de sistemas in vitro en los que la replicación puede llevarse a cabo en extractos celulares o mezclas de proteínas purificadas. En el más valioso de estos sistemas se ha utilizado la rana *Xenopus*, que comienza la vida en la forma de un enorme huevo que contiene todas las proteínas requeridas para llevar a cabo más de una docena de ciclos de división celular. Pueden prepararse extractos a partir de los oocitos de la rana, los cuales replican cualquier DNA que se agregue, sin importar cuál sea la secuencia. Los oocitos de la rana también mantienen la replicación y la división mitótica de los núcleos celulares de mamífero, por lo cual dichas estructuras son en particular útiles como sistema libre de células. Pueden usarse anticuerpos para eliminar de los extractos partículas proteicas específicas y de esta manera puede evaluarse la capacidad de replicación del extracto en la ausencia de las proteínas afectadas.

Inicio de la replicación en células eucariotas La replicación en *E. coli* comienza sólo en un sitio a lo largo del cromosoma circular (fig. 13-5). Las células de los organismos superiores pueden tener mucho más de mil veces el DNA que las bacterias tienen, si bien sus polimerasas incorporan nucleótidos en el DNA a velocidades mucho más lentas. Para adecuar estas diferencias, las células eucariotas replican su genoma en pequeñas porciones, denominadas *replicones*. Cada replicón tiene su propio origen de replicación desde el cual avanza la horquilla de replicación en ambas direcciones (véase fig. 13-24*a*). En las células humanas, la replicación comienza en alrededor de 10 000 a 100 000 diferentes orígenes de replicación. La existencia de replicones se demostró primero en experimentos de autorradiografías en los que las moléculas de DNA únicas mostraron que la replicación se llevaba a cabo de manera simultánea en diferentes sitios a lo largo de la molécula (fig. 13-19).

Alrededor de 10 a 15% de los replicones se dedica activamente a la duplicación en cualquier momento dado durante la fase S del ciclo de vida (véase fig. 14-1). Los replicones que se encuentran muy cerca entre sí en un cromosoma dado tienden a efectuar la replicación de forma simultánea (como es evidente en la figura 13-19). Sin embargo, estos replicones activos en un tiempo determinado durante un ciclo de síntesis de DNA tienden a ser activos en un estado comparable en los ciclos subsecuentes. En células de mamíferos, el tiempo de la replicación de una región cromosómica se correlaciona de manera regular con la actividad de los genes en la región o el estado de compactación. La presencia de histonas acetiladas, que están muy relacionadas con la transcripción de genes (pág. 526), es un factor común en la determinación de la replicación temprana de loci génicos activos. Las regiones más compactadas del cromosoma, que son las menos acetiladas, están empaquetadas en la heterocromatina

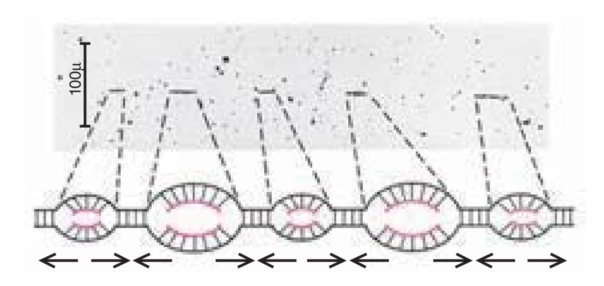


FIGURA 13-19 Demostración experimental de que la replicación en cromosomas eucariotas comienza en muchos sitios a lo largo del DNA. Las células se incubaron en [^{3}H] timidina por un breve periodo antes de la preparación de fibras de DNA para autorradiografía. Las líneas de los gránulos oscuros indican los sitios que han incorporado el precursor de DNA radiactivo durante el periodo de marcaje. Es evidente que la síntesis sucede en sitios separados a lo largo de la misma molécula de DNA. Como se indica en la línea trazada en la parte inferior, el inicio tiene lugar en el centro de cada sitio de la incorporación de timidina y se forman dos horquillas de replicación que se apartan una de la otra hasta que encuentran sus horquillas próximas. (Micrografía cortesía de Joel Huberman.)

(pág. 498) y son las últimas en replicarse. La diferencia en el tiempo de replicación no se relaciona con la secuencia del DNA debido a que la heterocromatina inactiva del cromosoma X en las células de hembra de mamífero (pág. 497) se replica en la parte final de la fase S, en tanto que la eucromatina del cromosoma X activo se replica en un estadio mucho más temprano.

El mecanismo por medio del cual la replicación se inicia en eucariotas fue tema importante de investigación en la década pasada. Los progresos más grandes en esta área se realizaron en las células de levadura debido a que los orígenes de replicación pueden removerse del cromosoma de levadura e insertarse en moléculas de DNA bacteriano, lo que confiere a estas bacterias la capacidad de replicarse en las células de levadura o extractos celulares que contienen las proteínas de replicación necesarias para el proceso. Puesto que estas secuencias promueven la replicación del DNA, tales secuencias se conocen como *secuencias de replicación autónoma* (*ARS*, del inglés *autonomous replicating sequences*). Las ARS que se han aislado y analizado comparten distintos elementos. El elemento central de una ARS consiste en una secuencia conservada de 11 pares de bases, que funciona como un sitio de unión específico para un complejo multiproteínico esencial llamado *complejo de reconocimiento de inicio* (*ORC*, del inglés *origin recognition complex*) (véase fig. 13-20). Si la ARS muta de modo que sea incapaz de unirse al ORC, no es posible el inicio de la duplicación.

Se ha probado que los orígenes de replicación de las células de vertebrado son más difíciles de estudiar que las células de levadura. Parte del problema se explica por el hecho de que virtualmente cualquier tipo de DNA purificado está disponible para la replicación mediante extractos celulares de oocitos de rana. Estos estudios sugieren que a diferencia de las levaduras, el DNA de vertebrados no posee secuencias específicas (p. ej., ARS) en los cuales se inicia la replicación. No obstante, los estudios de replicación de cromosomas de mamífero intactos in vivo sugieren que la replicación comienza en sitios específicos a lo largo del DNA, no tanto por una selección aleatoria, como ocurre en los extractos de oocitos de anfibio. Se piensa que una molécula de DNA contiene muchos sitios donde la duplicación del DNA *puede* iniciarse, pero que sólo un subconjunto de estos sitios se usa de hecho en un momento dado en una célula dada. Se considera que la elección real del sitios es regida por factores epigenéticos reales (pág. 506), como las posiciones de los nucleosomas, los tipos de modificaciones de histonas, el estado de metilación del DNA, el grado de superenrollamiento y el nivel de transcripción.

La replicación se restringe a una por cada ciclo celular Es esencial que cada porción del genoma se replique una vez, y sólo una vez, durante el ciclo celular. En consecuencia, deben existir mecanismos que eviten el reinicio de la replicación en el sitio en que ya se ha duplicado. El inicio de la replicación en un origen en particular requiere el paso del origen a través de diferentes estados. Algunos de estos pasos ocurren al parecer en el origen de replicación en una célula de levadura y se ilustran en la figura 13-20. Pasos similares requieren proteínas homólogas y se ha observado que se realizan en plantas y animales, lo cual sugiere que el mecanismo básico de inicio de la replicación está conservado entre los eucariotas.

1. En el paso 1 (fig. 13-20), al origen de replicación lo une un complejo proteico llamado ORC, que se relaciona con el origen a través del ciclo celular. Al ORC se lo ha denominado la "pista de aterrizaje molecular" en virtud de su papel en la unión de proteínas requeridas para los pasos subsecuentes.
2. Las proteínas que se conocen como "factores permisivos" se unen al ORC (paso 2, fig. 13-20) para ensamblar un complejo proteico-DNA, llamado *complejo de prerreplicación* (*pre-RC*), que es "permisivo" (competente) para iniciar la replicación. Los estudios de la naturaleza molecular de los factores permisivos han encontrado un grupo de seis proteínas Mcm relacionadas (Mcm2-Mcm7). Las proteínas Mcm se cargan en el origen de duplicación en una fase tardía de la mitosis, o poco tiempo después de ésta, y luego permanecen en un estado inactivo hasta que se inicia la duplicación un tiempo más tarde.
3. Justo antes del inicio de la fase S del ciclo celular, la activación de cinasas de proteína clave (paso 3, fig. 13-20) lleva al inicio de la replicación. Una de estas cinasas de proteína es una cinasa dependiente de ciclina (Cdk) cuya función se discute con detalle en el capítulo 14. La actividad de las Cdk es importante desde la fase S hasta la mitosis, la cual suprime la formación de nuevos complejos de prerreplicación. En consecuencia, cada origen sólo puede activarse una vez por cada ciclo celular. El final de la actividad de las Cdk en la última parte de la mitosis posibilita el ensamble del pre-RC para iniciar el próximo ciclo celular.
4. Una vez que la replicación comienza en la parte inicial de la fase S, las proteínas Mcm se mueven con la horquilla de replicación (paso 4) y son esenciales para completar la replicación de un replicón. Los estudios indican que las proteínas Mcm2-Mcm7 son capaces de relacionarse en un complejo semejante a un anillo que posee actividad de helicasa (como en el paso 4, fig. 13-20). Los investigadores que estudian la replicación del DNA en eucariotas han enfrentado grandes

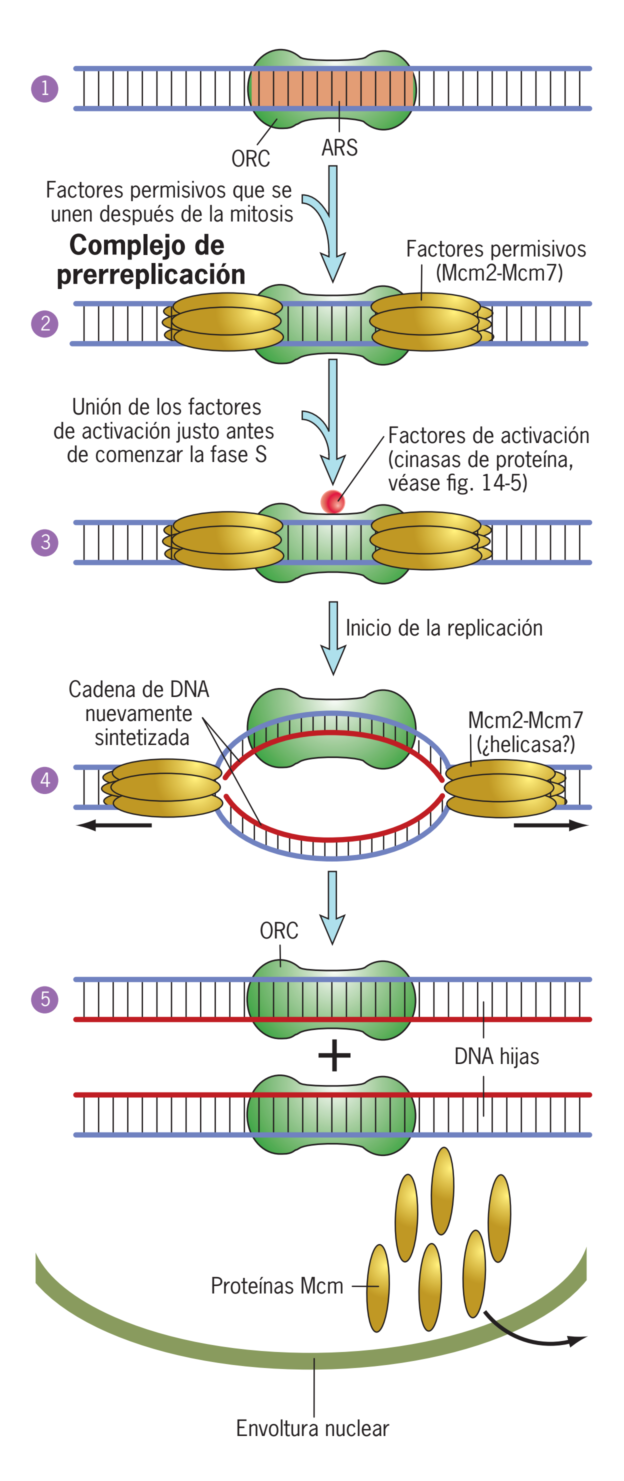


FIGURA 13-20 Pasos realizados en la replicación del replicón de levadura. Los orígenes de replicación de las levaduras contienen una secuencia conservada (ARS) que une el complejo de reconocimiento de origen de replicación (ORC) de multisubunidades (paso 1). La presencia del ORC unido es necesaria para el inicio de la replicación. El ORC se une al origen a través de todo el ciclo celular. En el paso 2, los factores permisivos (identificados como proteínas Mcm) se unen al origen durante los siguientes pasos de la mitosis y establecen un complejo de prerreplicación capaz de iniciar la replicación con los estímulos adecuados. La presencia de proteínas Mcm en el origen requiere proteínas adicionales (Cdc6 y Cdt1, que no se muestran). En el paso 3, la replicación del DNA se inicia después de la activación de cinasas de proteína específicas, incluida una cinasa dependiente de ciclina (Cdk). El paso 4 muestra un estado en el que la replicación ha avanzado corta distancia en ambas direcciones desde el origen. En este modelo, las proteínas Mcm forman una helicasa de DNA replicativa que desenrolla al DNA en direcciones opuestas desde las horquillas de replicación. Las otras proteínas requeridas para la replicación no se muestran en esta ilustración, pero sí en la figura siguiente. En el paso 5, las dos cadenas del dúplex original se han replicado, un ORC está presente en ambos orígenes y las proteínas de replicación, incluidas las helicasas Mcm, se han desplazado del DNA. En las levaduras, las proteínas Mcm migran desde el núcleo y el reinicio de la replicación no puede ocurrir hasta que la célula ha pasado por la mitosis. (En las células de vertebrados, diferentes sucesos parecen prevenir el reinicio de la replicación, entre ellos: 1) la continua actividad de la Cdk, 2) la fosforilación de Cdc6 y su exportación posterior desde el núcleo y 3) la inactivación de Cdt1 por la unión de un inhibidor.)

dificultades para identificar la principal helicasa de replicación, esto es, la helicasa encargada del desenrollamiento del DNA en la horquilla de replicación. Como se ha sugerido en la figura 13-20, el complejo proteico Mcm es un sólido candidato para la helicasa de replicación de eucariotas (de modo análogo a la DnaB en *E. coli*). El destino de las proteínas Mcm después de replicación depende de las especies estudiadas. En levaduras, las proteínas Mcm se desalojan de la cromatina y se movilizan desde el núcleo (paso 5). En cambio, las proteínas Mcm en las células de mamíferos se desplazan del DNA pero al parecer permanecen en el núcleo. A pesar de todo, las proteínas Mcm no pueden volver a relacionarse con un origen de replicación ya "utilizado".

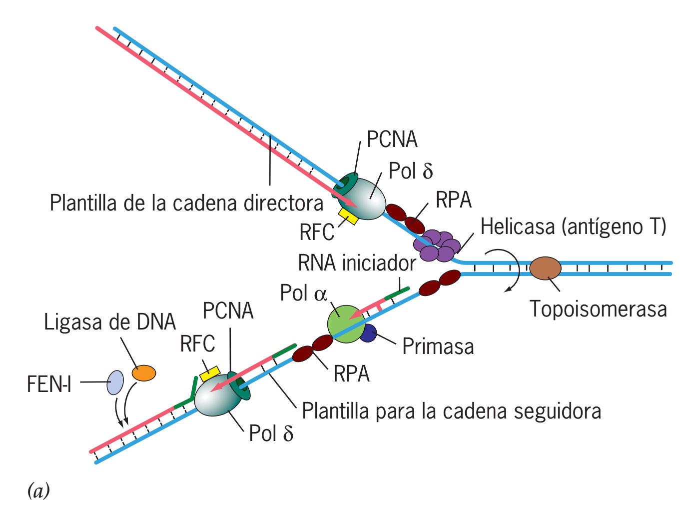
La horquilla de replicación eucariota En general, las actividades que ocurren en la horquilla de replicación son muy similares, sin importar cuál sea el tipo de genoma bajo replicación: vírica, procariota o eucariota. Las diferentes proteínas de la replicación, "el estuche de herramientas", de las células eucariotas se listan en el cuadro 13-1 y se muestran en la figura 13-21. Todos los sistemas de replicación requieren helicasas, proteínas de unión a DNA de cadena sencilla, topoisomerasas, primasa, polimerasa de DNA y ligasa de DNA. Como se discute en la sección previa, las helicasas que llevan a cabo el desenrollamiento del DNA durante la replicación no se han identificado con certidumbre. Cuando se estudia la replicación eucariota in vitro, los investigadores combinan a menudo proteínas de replicación de mamíferos con una helicasa vírica conocida como *antígeno T grande*, codificado por el genoma del virus SV40. Este antígeno induce la separación de las cadenas del origen de replicación de SV40 y desenrolla el DNA para que avance la horquilla de replicación (como se muestra en la figura 13-21*a*).

Como en las bacterias, el DNA de una célula eucariota se sintetiza de una manera semidiscontinua, pese a que los fragmentos de Okazaki de cadena retrasada son considerablemente más pequeños que en una bacteria, cercanos a 150 nucleótidos de longitud. Como en la polimerasa de DNA III de *E. coli*, la polimerasa que replica el DNA eucariota está presente como un dímero, lo que sugiere que las cadenas adelantada y retrasada se sintetizan de una manera coordinada por un solo complejo de replicación o replisoma (fig. 13-21*b*).

Cuadro 13-1 Algunas proteínas requeridas para la replicación

Proteína en *E. coli*	Proteína eucariota	Función
DnaA	Proteínas ORC	Reconocimiento del origen de la replicación
Girasa	Topoisomerasas I/II	Libera supercolas positivas antes de la replicación
DnaB	Mcm	Helicasa de DNA que desenrolla el dúplex parental
DnaC	?	Coloca la helicasa sobre el DNA
SSB	RPA	Mantiene el DNA en un estado de cadena sencilla
Complejo γ	RFC	Subunidades de la holoenzima de la polimerasa de DNA que montan la pinza sobre el DNA
Núcleo de la polimerasa III	Polimerasa δ/ϵ	Enzima de replicación primaria; sintetiza por completo la cadena adelantada y los fragmentos de Okazaki; tiene capacidad de lectura y corrección
pinza β	PCNA	Subunidad en forma de anillo de la holoenzima de la polimerasa de DNA que pinza la polimerasa replicante sobre el DNA; trabaja con la polimerasa III en *E. coli* y la polimerasa δ o ϵ en eucariotas
Primasa	Primasa	Sintetiza iniciadores de RNA
———	Polimerasa α	Sintetiza oligonucleótidos cortos de DNA como parte del iniciador RNA-DNA
Ligasa de DNA	Ligasa de DNA	Une a los fragmentos de Okazaki en una cadena continua
Pol I	FEN-1	Remueve a los iniciadores de RNA; la polimerasa I de *E. coli* también llena los espacios con DNA

En la actualidad se han aislado las cinco polimerasas de DNA "típicas" de las células eucariotas y se conocen como α, β, γ, δ y ϵ. De estas enzimas, la polimerasa γ replica el DNA mitocondrial y la β funciona en la reparación del DNA. Las otras tres tienen funciones de replicación. La polimerasa α está muy relacionada con la primasa y juntas inician la síntesis de cada fragmento de Okazaki. La primasa comienza la síntesis por el ensamble de un iniciador corto de RNA, el cual se amplía por la adición de unos 20 desoxirribonucleótidos por medio de la polimerasa alfa. La polimerasa delta es al parecer la enzima que sintetiza de modo primario al DNA durante la replicación. De la misma manera que la principal enzima de replicación de *E. coli*, la polimerasa delta requiere una "pinza con deslizamiento" que mantiene unida la enzima al DNA y ello hace posible a ésta



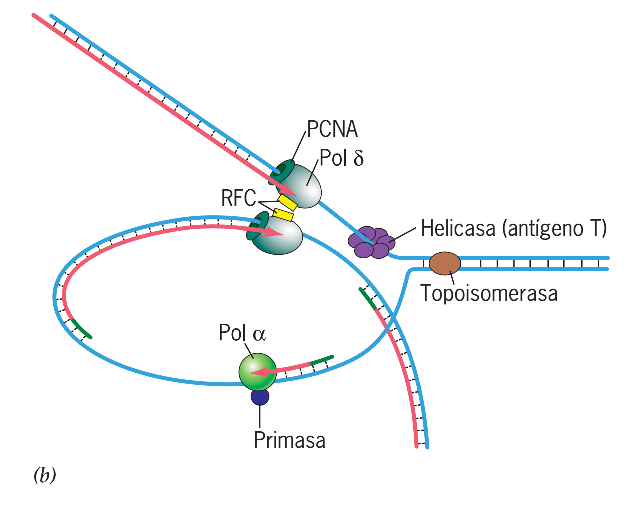


FIGURA 13-21 Esquema de los componentes principales de la horquilla de duplicación en los eucariotas. *a*) Proteínas necesarias para la duplicación en los eucariotas. El antígeno vírico T se muestra como la helicasa de duplicación en esta figura debido a que se usa de manera predominante en los estudios in vitro de la duplicación del DNA y la helicasa real no se conoce. Se piensa que la polimerasa de DNA δ es la principal enzima que sintetiza DNA, pero es posible que la polimerasa ϵ también participe en esta actividad. El PCNA actúa como una pinza (o, de manera más precisa, como una abrazadera) deslizante para ambas polimerasas, δ y ϵ. La pinza deslizante es colocada ("cargada") en el DNA por la proteína RFC (factor de duplicación C), que es similar en estructura y función al cargador de pinza γ de *E. coli*. RPA es una proteína trimérica de unión a DNA monocatenario comparable en función a la proteína SSB utilizada en la duplicación de *E. coli*. El movimiento continuo de la polimerasa δ desplaza los iniciadores de RNA-DNA sintetizados por el complejo polimerasa α-primasa, lo que genera una "aleta" de RNA-DNA que es eliminada por la endonucleasa FEN-1. Una ligasa de DNA sella el hueco. Como en *E. coli*, se requiere una topoisomerasa para eliminar los superenrollamientos positivos que se forman antes de la horquilla de duplicación. *b*) Versión simplificada de los sucesos ocurridos en la horquilla de duplicación que muestra de qué manera las polimerasas de duplicación actúan juntas como parte de un replisoma sobre las plantillas, directora y seguidora.

moverse de manera continua a lo largo del molde. La pinza de deslizamiento de las células eucariotas es muy similar en estructura y función a la pinza beta de la polimerasa III de *E. coli* que se muestra en la figura 13-14. En eucariotas, la pinza de deslizamiento se conoce como PCNA.[3] La pinza cerradora que coloca al PCNA sobre el DNA se llama RFC y es análoga al complejo cebador de pinza de la polimerasa III de *E. coli.* Después de sintetizar un iniciador de RNA-DNA, la polimerasa α es sustituida en la unión de plantilla e iniciador por el complejo PCNA-polimerasa δ, que completa la síntesis del fragmento de Okazaki. Cuando la polimerasa δ alcanza el extremo 5′ del fragmento de Okazaki recién sintetizado, la polimerasa continúa a lo largo de la plantilla de la cadena seguidora, desplazando al iniciador (mostrada como una aleta verde en la figura 13-21*a*). Una endonucleasa (FEN-1) corta el DNA recién sintetizado el iniciador desplazado, y una ligasa de DNA sella la muesca resultante en el DNA. La determinación del papel de la polimerasa ϵ ha resultado problemática; en apariencia, interviene en la replicación del DNA nuclear debido a que el proceso no puede terminarse en las células que carecen de esta polimerasa. Por otra parte, la polimerasa ϵ no es necesaria para la replicación in vitro del DNA del virus SV40. Otras polimerasas de DNA diferentes (entre ellas eta, kappa e iota) poseen una función especializada que permite a las células replicar el DNA dañado como se describe en la página 567.

Como las polimerasas procariotas, todas las polimerasas de eucariotas construyen las cadenas de DNA en una dirección 5′ → 3′ al agregar nucleótidos a los grupos hidroxilo 3′ y ninguno de éstos es capaz de iniciar la síntesis de un DNA sin un iniciador. Las polimerasas gamma, delta y épsilon poseen una exonucleasa 3′ → 5′, cuya actividad de lectura y corrección garantiza que esta replicación ocurra con una gran eficiencia.

Replicación y estructura nuclear En este punto del capítulo, las ilustraciones de la replicación muestran a una polimerasa replicante que se mueve como una locomotora a lo largo de una vía estacionaria de DNA. Sin embargo, el aparato de replicación consiste en un complejo de proteínas que opera dentro de los confines de un núcleo estructurado. Mucha evidencia sugiere que la maquinaria de replicación está presente en estrecha conexión con la lámina nuclear (pág. 487) y con la matriz nuclear (pág. 508). Cuando las células se someten a pulsos muy cortos de precursores de DNA radiactivo, más de 80% de la marca incorporada se vincula con la matriz nuclear. Si en lugar de fijar las células inmediatamente después del pulso se les permite incorporar precursores de DNA *no marcado* por una hora o más antes de la fijación, la mayor parte de la radiactividad se detecta en la matriz, en las asas del DNA circundante. Este último hallazgo sugiere que más que permanecer estacionario, el DNA en replicación se mueve como un convoy a través de un aparato de replicación inmóvil (fig. 13-22).

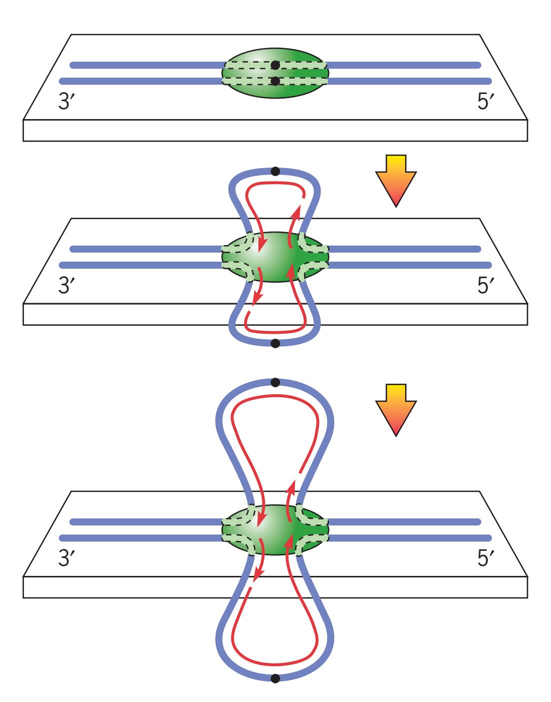


FIGURA 13-22 Función de la matriz nuclear en la replicación del DNA. Los orígenes de la replicación se muestran como puntos negros y las flechas indican la dirección del crecimiento de las cadenas. De acuerdo con este modelo esquemático, la maquinaria de replicación no se mueve a lo largo de segmentos estacionarios de DNA, pero el DNA se impulsa a través del aparato de replicación que está unido firmemente a la matriz nuclear.

Estudios adicionales señalan que la horquilla de replicación activa en un momento particular no se distribuye de forma aleatoria a través del núcleo celular; en realidad, se localiza en 50 a 250 sitios, conocidos como **lugares de replicación** (fig. 13-23). Se estima que cada uno de los puntos luminosos rojos indicados en la figura 13-23 contiene alrededor de 40 horquillas de replicación que incorporan nucleótidos en las cadenas de DNA de manera simultánea. El agrupamiento de asas de horquillas de replicación puede proveer un mecanismo para la coordinación de la replicación de los replicones adyacentes en cromosomas individuales (como se muestra en la figura 13-19).

Estructura de la cromatina y replicación Los cromosomas de las células eucariotas poseen un DNA que forma complejos en configuraciones regulares de las proteínas histónicas. El examen de una molécula de DNA en replicación por medio de microscopia electrónica muestra nucleosomas en ambas cadenas dúplex apenas formadas muy cercanas a la horquilla de replicación (fig. 13-24*a*), lo que indica que el ensamble del DNA en los nucleosomas es un suceso muy rápido. Como se señaló en la página 493, el núcleo de la histona octamérica de un nucleosoma consiste en un tetrámero $(H3H4)_2$ junto con un par de dímeros H2A/H2B. Numerosos estudios sugieren que los tetrámeros $(H3H4)_2$ presentes antes de la replicación permanecen intactos y se distribuyen de modo aleatorio entre los dos dúplex hijos. Como resultado, los tetrámeros $(H3H4)_2$ viejos y nuevos están entremezclados en cada molécula de DNA hija como se indica en la figura 13-24*b*. En cambio, los dos dímeros H2A/H2B

[3] PCNA es el acrónimo de *proliferating cell nuclear antigen*. Esta proteína se descubrió como un antígeno que reaccionaba con autoanticuerpos en el suero de pacientes con lupus eritematoso y después se localizó en el núcleo de las células que proliferaban con gran rapidez. Sólo después se reconoció su función en la replicación. Se ha dicho que el PCNA es un "equipo de herramientas moleculares", porque se une a muchas proteínas distintas implicadas en la duplicación y la reparación del DNA.

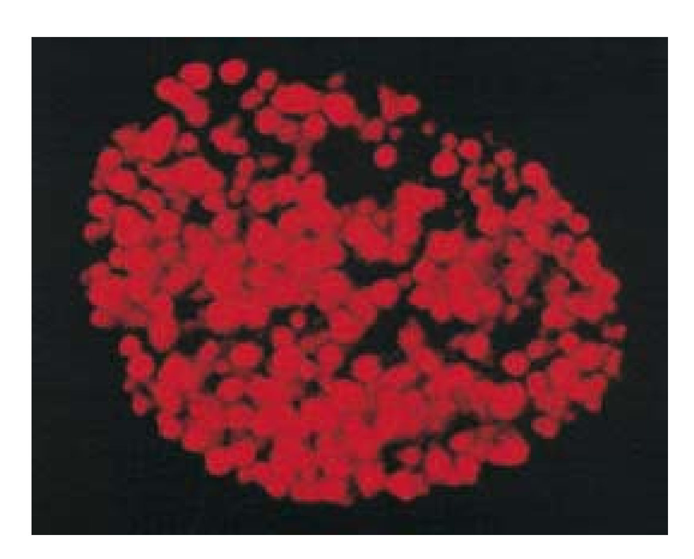
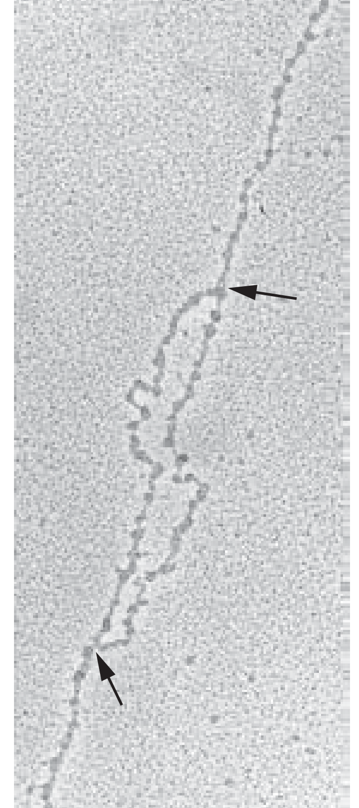


FIGURA 13-23 Demostración de que las actividades de replicación no se realizan de manera aleatoria en el núcleo, pero se confinan a distintos sitios. Antes del comienzo de la síntesis del DNA al principio de la fase S, diferentes factores requeridos para el inicio de la replicación se ensamblan en sitios discretos dentro del núcleo y forman centros de prerreplicación. Los sitios se observan como pequeños objetos rojos en la micrografía teñida con un anticuerpo fluorescente dirigido contra el factor de replicación A (RPA), el cual es una proteína de unión del DNA de cadena sencilla requerida para comenzar la replicación. Otros factores de replicación, como el PCNA y el complejo polimerasa-primasa también se localizan en estos sitios. (TOMADA DE YASUHISA ADACHI Y ULRICH K. LAEMMLI, EMBO J. VOL. 13, PORTADA DEL NÚM. 17, 1994.)

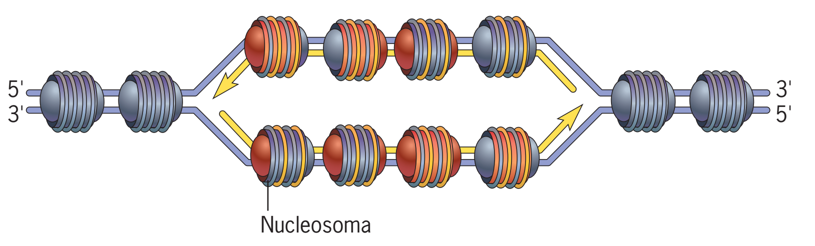
de cada nucleosoma parental no permanecen juntos conforme avanza la horquilla de replicación a través de la cromatina. De hecho, los dímeros de un nucleosoma se separan el uno del otro y parecen unirse azarosamente a los nuevos y viejos tetrámeros $(H3H4)_2$ ya presentes en los dúplex hijos (fig. 13-24*b*). Una red de proteínas accesorias facilita el paso del ensamble de los nucleosomas y su ordenamiento espaciado a lo largo del DNA.

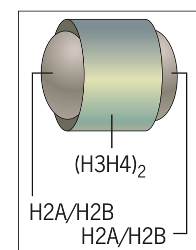
REVISIÓN

1. La propuesta original de Watson y Crick para la replicación del DNA predecía la síntesis continua de las cadenas de DNA. ¿Cómo y por qué este concepto se ha modificado en los años posteriores?
2. ¿Qué significa que la replicación sea semiconservadora?, ¿cómo se demostró esta propiedad de la replicación en células bacterianas y células eucariotas?
3. ¿Por qué no existen cadenas pesadas en la parte superior de los tres tubos de centrifugación de la figura 13-3*a*?
4. ¿Cómo es posible obtener mutantes cuyos defectos se localizan en genes que se requieren para la actividad esencial como la replicación del DNA?
5. Describa los sucesos que ocurren en el origen de la replicación durante el inicio de la replicación en las células de levadura. ¿Cuál es el sentido de que la replicación sea bidireccional?
6. ¿Qué hace que las moléculas de DNA que se muestran en la figura 13-7*a* sean incapaces de estimular la polimerización de nucleótidos por medio de la polimerasa de DNA I?, ¿qué propiedades de una molécula de DNA debe tener para que sirva como un molde para la incorporación de nucleótidos por medio de la polimerasa de DNA I?



(*a*)





(*b*)

FIGURA 13-24 Distribución de complejos de núcleos de histona a las cadenas hijas después de la replicación. *a*) Micrografía electrónica de la cromatina aislada de un núcleo en división rápida del embrión de *Drosophila* en el que se muestra un par de horquillas de replicación (flechas) que se alejan una de la otra en direcciones opuestas. Entre las dos horquillas de replicación se observan regiones de DNA nuevamente replicado ya cubiertas por partículas nucleosomales con una densidad semejante a la de las cadenas parentales que todavía no han sufrido la replicación. *b*) Diagrama esquemático de la configuración de los nucleosomas después de la replicación del DNA. Cada partícula nuclear del nucleosoma en el esquema se compone de un tetrámero $(H3H4)_2$ central flanqueado por dos dímeros H2A/H2B. Las histonas presentes en los nucleosomas parentales antes de la replicación se indican en azul; las histonas recién sintetizadas aparecen en rojo. Los tetrámeros $(H3H4)_2$ permanecen intactos y están distribuidos de modo aleatorio en ambos dúplex descendientes. Los pares de dímeros H2A/H2B presentes en los nucleosomas parentales se separan y al parecer se recombinan al azar con los tetrámeros $(H3H4)_2$ en los dúplex hijos. (*A*, CORTESÍA DE STEVEN L. MCKNIGHT Y OSCAR L. MILLER, JR.

7. Describa los mecanismos de acción de las polimerasas del DNA que operan en las dos cadenas de DNA molde y el efecto que éste tiene en la síntesis de la cadena retrasada en comparación con la cadena adelantada.
8. Compare la función de las polimerasas de DNA I y III en la replicación bacteriana.
9. Describa las funciones de la helicasa de DNA, proteínas SSB, pinza beta, girasa de DNA y ligasa de DNA durante la replicación en las bacterias.
10. ¿Cuál es la consecuencia de que el DNA de molde para la cadena retrasada forme un asa sobre sí misma como se muestra en la figura 13-3*a*?
11. ¿Por qué las dos actividades de exonucleasa de la polimerasa de DNA I difieren entre sí?, ¿cuáles son sus funciones respectivas en la replicación?
12. Describa los factores que contribuyen a la gran fidelidad durante la replicación del DNA.
13. ¿Cuál es la principal diferencia entre las bacterias y los eucariotas que le permite a éstos replicar su DNA en un tiempo razonable?

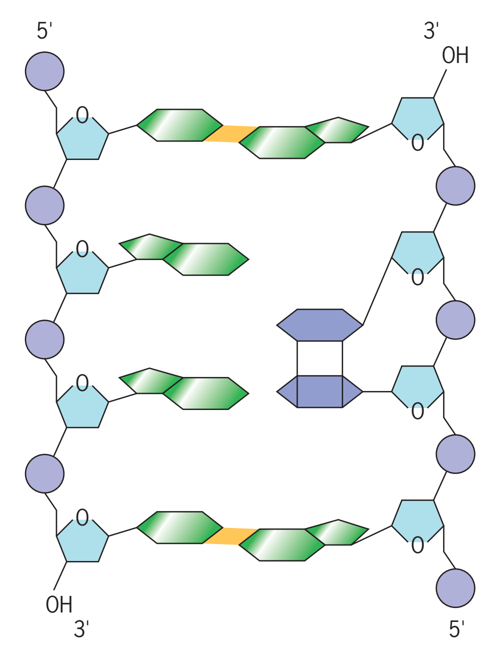


FIGURA 13-25 Un dímero de pirimidina formado dentro del DNA dúplex después de la radiación con luz ultravioleta.

13.2 REPARACIÓN DEL DNA

La vida en la Tierra está sujeta a múltiples fuerzas destructivas que se originan en el interior y el ambiente externo de un organismo. De todas las moléculas en una célula, el DNA está colocado en la posición más precaria. Por un lado, es esencial que la información genética permanezca de manera primordial sin cambio conforme ésta pasa de una célula a la siguiente y de un individuo a otro. Por otra parte, el DNA es una de las moléculas celulares más susceptible a daño ambiental. Cuando se afecta por radiación ionizante, el esqueleto de la molécula de DNA sufre con frecuencia roturas; cuando se expone a diversos reactivos químicos, algunos de los cuales se generan por el metabolismo de la célula misma, las bases de una molécula de DNA pueden alterarse de manera estructural; cuando se someten a radiación de tipo ultravioleta, las pirimidinas adyacentes en las cadenas de DNA tienen una tendencia a interactuar entre sí para formar complejos covalentes y crear un dímero (fig. 13-25). De igual forma, la absorción de energía térmica producida por el metabolismo es suficiente para eliminar las bases de adenina y guanina de su unión a los azúcares en el esqueleto de DNA. ¡La magnitud de estas alteraciones espontáneas, o *lesiones*, puede reconocerse si se considera que cada célula de un mamífero de sangre caliente pierde alrededor de 10 000 bases por día! La falla para reparar estas lesiones produce anomalías permanentes, o mutaciones, en el DNA. Si la mutación tiene lugar en una célula destinada a ser un gameto, la alteración genética puede pasar de una generación a la próxima. Las mutaciones también tienen efectos en las células somáticas (p. ej., células que no pertenecen a la línea germinal): pueden interferir con la transcripción y la replicación, lo que causa la transformación maligna de una célula o acelera el proceso por medio del cual un organismo envejece.

Al considerar las consecuencias potencialmente lesivas de las alteraciones en las moléculas del DNA y la elevada frecuencia con que suceden, es esencial que las células posean mecanismos para reparar el DNA dañado. De hecho, las células tienen una amplia variedad de sistemas de reparación que corrigen casi cualquier tipo de daño al cual una molécula de DNA es vulnerable. Se ha estimado que menos de un cambio de base en miles escapa a los sistemas de reparación en una célula. La existencia de estos sistemas provee un excelente ejemplo de los mecanismos moleculares que mantienen la homeostasis celular. La importancia de la reparación del DNA puede reconocerse al examinar las consecuencias que tiene en los seres humanos el resultado de las deficiencias en la reparación del DNA, un tema que se discute en la sección Perspectiva humana de este capítulo.

Tanto las células de procariotas como las de eucariotas poseen una variedad de proteínas que recorren extensos tramos de DNA y buscan alteraciones químicas o distorsiones sutiles del dúplex de DNA. En algunos casos, el daño puede repararse de modo directo. Por ejemplo, los seres humanos tienen enzimas que pueden reparar de forma inmediata el daño producido por agentes alquilantes capaces de causar cáncer. Sin embargo, casi todos los sistemas de reparación requieren que la sección dañada del DNA se *elimine*, esto es, se remueva de manera selectiva. Una de las grandes virtudes del DNA dúplex es que cada cadena contiene la información necesaria para la construcción de su contraparte. Por consecuencia, si uno o más nucleótidos se remueven de una cadena, la cadena complementaria puede servir como molde para la reconstrucción del dúplex. La reparación del daño del DNA en células eucariotas es complicada por la inaccesibilidad relativa del DNA dentro de las fibras de cromatina plegadas del núcleo. Como en el caso de la transcripción,

la reparación del DNA requiere de máquinas que remodelan la cromatina, como enzimas modificadoras de histonas y complejos remodeladores de nucleosomas que se exponen en la página 526. Aunque es de esperar que sean importantes en la reparación del DNA, los cometidos de estas proteínas no se consideran en la siguiente exposición.

Escisión de nucleótidos y reparación

La **reparación de la escisión nucleotídica** (**NER**) opera por un mecanismo de corte y pegado que remueve diferentes lesiones al DNA, incluidos los dímeros de pirimidina y los nucleótidos en los cuales distintos grupos químicos se unen. Se conocen dos vías de NER:

1. Una *vía acoplada a la transcripción* en la cual las cadenas de DNA molde de los genes que se transcriben de forma activa se reparan de manera preferencial. La reparación de una cadena molde ocurre al parecer a medida que el DNA se transcribe y la presencia de la lesión puede señalarla una polimerasa de RNA atorada. Esta vía de reparación preferencial garantiza que estos genes de gran importancia para la célula, que son los genes que la célula transcribe de manera activa, reciban la prioridad más alta en la "lista de reparación".
2. Un mecanismo lento y menos eficiente es la *vía genómica global* que corrige las cadenas de DNA en el resto del genoma.

A pesar de que el reconocimiento de la lesión lo realizan quizá diferentes proteínas en las dos vías de NER (paso 1, fig. 13-26), los pasos que suceden durante la reparación de la lesión son muy similares, como se indica en los pasos 2 a 6 de la figura 13-26. Uno de los componentes clave de la maquinaria de la NER es el factor TFIIH, una gran proteína que también participa en el inicio de la transcripción. El descubrimiento de la participación de TFIIH estableció un nexo crucial entre la transcripción y la reparación del DNA, dos procesos que antes ya se asumía que eran independientes el uno del otro (se analizan en la sección Vías experimentales y pueden revisarse en *www.wiley.com/college/karp*). Incluidas dentro de las diferentes subunidades de TFIIH están dos subunidades (XPB y XPD) que poseen actividad de helicasa; estas enzimas separan las dos cadenas del dúplex (paso 2, fig. 13-26) en la preparación para la remoción de las lesiones. Un par de endonucleasas (paso 3) corta entonces la cadena dañada en ambos lados de la lesión y el segmento de DNA se elimina (paso 4). Una vez suprimido, el espacio se reocupa por medio de una polimerasa de DNA (paso 5) y la cadena se liga por medio de una ligasa de DNA (paso 6).

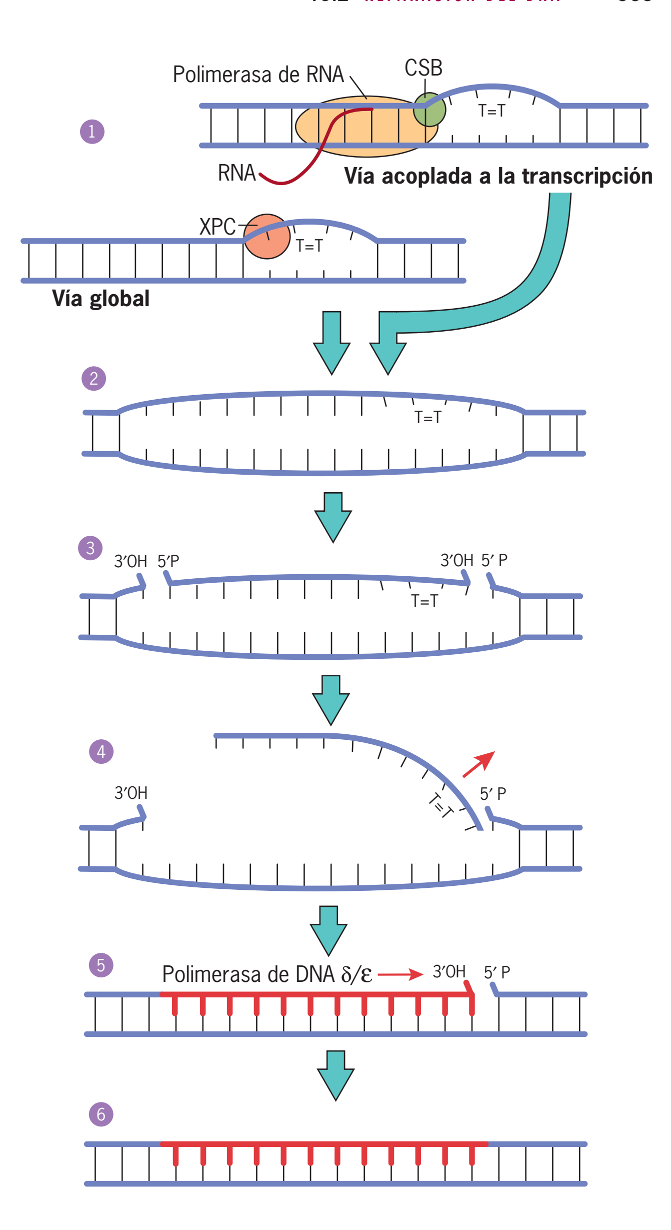


FIGURA 13-26 Reparación de la escisión de nucleótido. Los siguientes pasos se muestran en el diagrama y se describen en el texto: 1) el reconocimiento del daño en la vía global lo media una proteína XPC, pero el reconocimiento del daño en las vías acopladas a la transcripción tiene quizás la mediación de una polimerasa de RNA en conjunción con una proteína CSB; 2) separación de las cadenas de DNA (por medio de las proteínas XPB y XPD, dos subunidades de helicasa de TFIIH); 3) corte (mediante la proteína XPG en el extremo 3′ y el complejo XPF-ERCC1 en el extremo 5′); 4) eliminación; 5) reparación del DNA por medio de la síntesis (a través de una polimerasa de DNA delta o épsilon), y 6) ligación (mediante una ligasa de DNA I).

Reparación de la escisión de bases

Un sistema de reparación de escisión separado opera para eliminar los nucleótidos alterados generados por los reactivos químicos presentes en la dieta o por el metabolismo. Los pasos en esta vía de reparación en eucariotas, que recibe el nombre de **reparación de la escisión de bases** (**BER**), se muestran en la figura 13-27. El proceso de BER lo inicia una *glucosilasa de DNA* que reconoce la alteración (paso 1, fig. 13-27) y remueve la base por medio del corte del enlace glucosídico que une la base al azúcar de desoxirribosa (paso 2). Se han identificado diferentes glucosilasas de DNA, cada una de ellas más o menos específica para un tipo en particular de base alterada, incluidos el uracilo (formado por la remoción hidrolítica del grupo amino de la citosina), la 8-oxo-guanina (secundaria al daño de radicales libres del oxígeno, página 34) y la 3-metiladenina (generada por la transferencia de un grupo metilo de un donante de metilos, página 440).

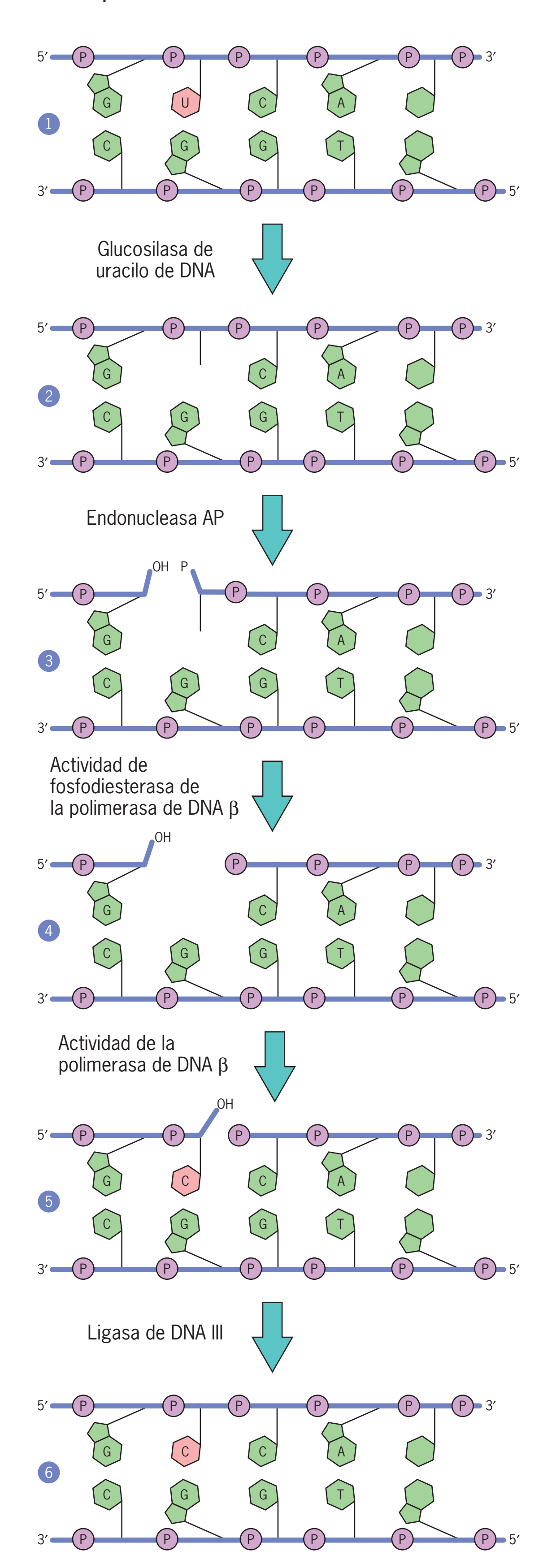


FIGURA 13-27 Reparación de la escisión de bases. Los pasos se describen en el texto. Se conocen otras vías para la BER y se ha mostrado que este mecanismo posee otras vías acopladas para la transcripción y reparación global.

Estudios estructurales de la glucosilasa de DNA que elimina 8-oxoguanosina (oxoG) indican que esta enzima se mueve a lo largo del DNA "inspeccionando" cada uno de los pares de bases G-C dentro del dúplex de DNA (fig. 13-28, paso 1). Durante el proceso de inspección, cualquier base que esté pareada con una citosina al parecer es desviada 180° fuera de la hélice de DNA y hacia el cuerpo de la enzima (paso 2). Si la base que se inspecciona resulta ser una oxoG, embona en el sitio activo de la enzima (paso 3) y es escindida de su azúcar complementario. En cambio, si la base extruida es una guanina normal, que sólo difiere en estructura de la oxoG por dos átomos, es incapaz de embonar en el sitio activo de la enzima (paso 4) y es devuelta a su posición apropiada dentro de la pila de bases. Una vez que la purina o pirimidina alterada se elimina, el remanente "decapitado" de la desoxirribosa de fosfato en el sitio se suprime por la acción combinada de una endonucleasa especializada (AP) y una polimerasa de DNA. La AP corta el esqueleto de DNA (fig. 13-27, paso 3) y la actividad de fosfodiesterasa de la polimerasa beta remueve el azúcar-fosfato remanente que estaba unido a la base eliminada (paso 4). La polimerasa beta ocupa entonces el espacio al insertar un nucleótido complementario a la cadena no dañada (paso 5) y la cadena se liga por medio de una ligasa de DNA III (paso 6).

El hecho de que la citosina pueda convertirse en uracilo puede explicar por qué la selección natural favoreció el uso de la timina, más que el uracilo, como una base del DNA, a pesar de que el uracilo estuvo al parecer presente en RNA cuando éste sirvió como material genético durante la evolución temprana de la vida (pág. 457). Si el uracilo se hubiera retenido como una base de DNA habría causado dificultades en los sistemas de reparación para distinguir entre un uracilo "relacionado" con un sitio particular y uno que se generó a partir de una alteración de la citosina.

Reparación de la unión deficiente

Ya se mencionó que las células pueden eliminar bases mal unidas incorporadas por la polimerasa de DNA y las que se escapan de la lectura y corrección por medio de la enzima exonucleasa. Este proceso se conoce como **reparación de la unión deficiente** (**MMR**). Un apareamiento erróneo de pares de bases causa una distorsión en la geometría de la doble hélice que puede reconocer una enzima de reparación. Empero, ¿de qué forma la enzima par "reconoce" qué miembro del apareamiento erróneo es el nucleótido incorrecto? Si se eliminara uno de los nucleótidos al azar, debería haber una probabilidad de cometer error en 50% de las veces, lo que crearía una mutación permanente en el sitio. Por lo tanto, para reparar el problema del apareamiento erróneo luego que la polimerasa de DNA pasa por el sitio, es indispensable que el sistema de reparación pueda distinguir la cadena recién sintetizada que contiene el nucleótido incorrecto de la cadena progenitora que posee el nucleótido correcto. En *E. coli*, las dos cadenas se distinguen por la presencia o ausencia de grupos metilo. La cadena parental tiene grupos metilo unidos a ciertos residuos de adenosina, aunque la cadena sintetizada de novo no se metila por un periodo después de la replicación. El sistema de reparación vigila al DNA antes de este paso de metilación; cuando un apareamiento erróneo se reconoce, la enzima siempre remueve y remplaza los nucleótidos de la cadena no metilada, lo cual garantiza que ésta restaure el par de bases original. La metilación del DNA parece que no se utiliza como un

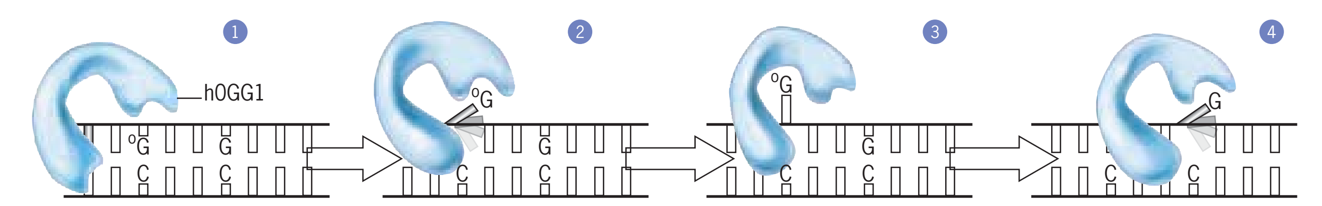
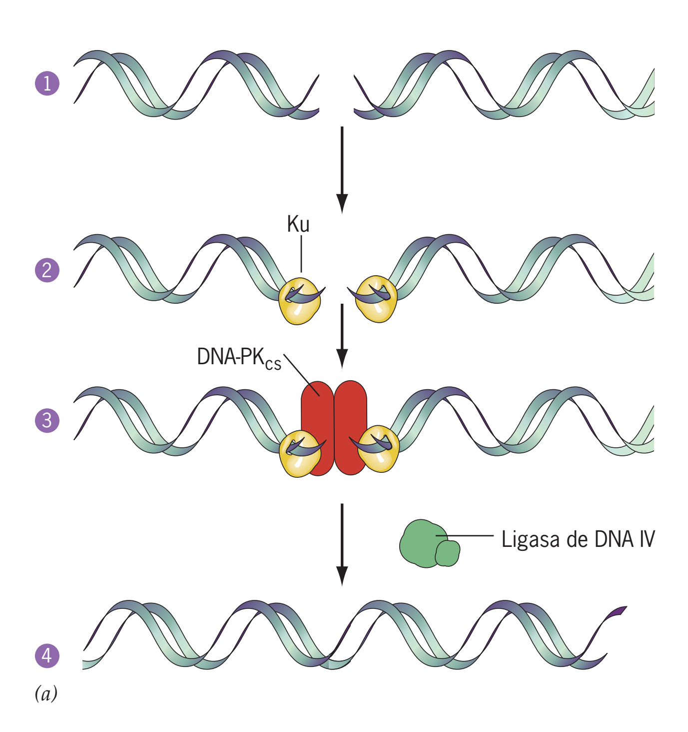


FIGURA 13-28 Detección de daños de bases durante la BER. En el paso 1, una glucosilasa de DNA (llamada hOGG1) inspecciona una base pareada con citosina. En el paso 2, la base es proyectada fuera del dúplex de DNA. En este caso, la base resulta ser una versión oxidada de guanina, la 8-oxoguanina, y tiene la capacidad de embonar en el sitio activo de la enzima (paso 3) en el punto en que se escinde de su azúcar acompañante. Los pasos posteriores de la BER se mostraron en la figura 13-27. En el paso 4, el azúcar extruido es una guanina normal, que no embona en el sitio activo de la glucosilasa y es devuelta a la pila de bases. (BASADA EN UNA FIGURA DE S. S. DAVID, CON AUTORIZACIÓN DE NATURE 434:569, 2005; © COPYRIGHT 2005 POR MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)

sistema de reparación de apareamiento erróneo en eucariotas y el mecanismo de identificación de la cadena nuevamente sintetizada permanece todavía indefinido.

Reparación de la rotura de doble cadena

Los rayos X, los rayos gamma y las partículas liberadas por los átomos radiactivos se describen como *radiación ionizante* debido a que generan iones que atraviesan la materia. Millones de rayos gamma pasan a través del cuerpo cada minuto. Cuando estas formas de radiación colisionan con una molécula frágil, como el DNA, provocan a menudo roturas en ambas cadenas de la doble hélice. Las **roturas de la doble cadena** (**DSB**) también pueden deberse a ciertos químicos, incluidos los utilizados en la quimioterapia del cáncer (p. ej., bleomicina) y radicales libres generados por el metabolismo normal de la célula (pág. 34). Las DSB también se inducen durante el daño al DNA en la replicación. Una sola rotura de la doble cadena puede causar anormalidades cromosómicas serias y, al final, son letales para las células. Las DSB pueden repararse por medio de diferentes vías alternas. La vía principal en las células de mamíferos se llama *unión de extremos no homólogos* (*NHEJ*), en la cual un complejo de proteínas se une a los extremos rotos del dúplex de DNA y cataliza una serie de reacciones que de nueva cuenta une las cadenas rotas. Los pasos que suceden durante la NHEJ se describen en la figura 13-29*a*. La figura 13-29*b* muestra los núcleos de fibroblastos humanos previamente tratados con láser para inducir un grupo localizado de rotura de la doble cadena y luego teñidos para detectar la presencia de la proteína Ku en varios instantes



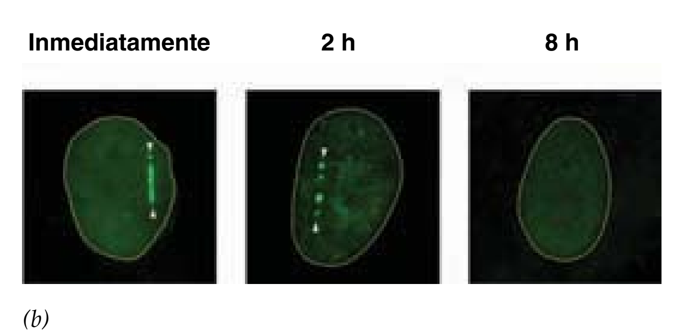


FIGURA 13-29 Reparación de la rotura de doble cadena por medio de la unión de extremos no homólogos. *a*) En este modelo simplificado de la reparación de la rotura de la doble cadena, una proteína heterodimérica en forma de anillo llamada Ku detecta la lesión (paso 1) y se une a los extremos rotos del DNA (paso 2). La proteína Ku unida al DNA recluta a otra proteína, denominada DNA-PK_{cs}, la cual es la subunidad catalítica de una cinasa dependiente de DNA (paso 3). Los sustratos fosforilados por esta cinasa de proteína se desconocen. Estas proteínas mantienen juntos los extremos del DNA roto en una forma tal, que es posible que los una la ligasa de DNA IV para regenerar un DNA dúplex intacto (paso 4). *b*) Análisis temporal de la localización de Ku en sitios de formación de DSB inducida por la radiación con microhaces láser en un sitio indicado por las puntas de flecha. La proteína Ku NHEJ se localiza en el sitio del daño inmediatamente después de la radiación pero sólo permanece ahí un breve instante, que se supone es lo que dura la reparación del daño. Las micrografías se tomaron 1) inmediatamente después, 2) a las 2 h y 3) 8 h después de la radiación. (*B*, TOMADA DE JONG-SOO KIM, ET AL., CORTESÍA DE KYOKO YOKOMORI, J. CELL BIOL. 170:344, 2005; CON AUTORIZACIÓN DEL TITULAR DEL COPYRIGHT, LA ROCKEFELLER UNIVERSITY.)

después del tratamiento con láser. Se observa que esta proteína de reparación NHEJ se localiza en el sitio de las DSB inmediatamente después de su aparición. Las células que pierden una de las proteínas requeridas para el proceso de NHEJ son muy sensibles a la radiación ionizante. Otra vía de reparación de la rotura de la doble cadena incluye la recombinación genética y es considerablemente más compleja. Los defectos en ambas vías de reparación se han vinculado con un incremento de la susceptibilidad al cáncer.

REVISIÓN ?

1. Compare los sucesos de la reparación de la escisión de nucleótidos y la reparación de la escisión de bases.
2. ¿Por qué es importante en la reparación del apareamiento erróneo que la célula distinga las cadenas parentales de las cadenas nuevamente sintetizadas?, ¿cómo se lleva a cabo lo anterior?

PERSPECTIVA HUMANA

Consecuencias de las deficiencias del sistema de reparación del DNA

Nuestra existencia es posible por la luz solar, que suministra la energía captada durante la fotosíntesis. Sin embargo, el Sol también emite una corriente continua de rayos ultravioleta que envejece y provoca mutaciones en las células de la piel. Los efectos nocivos del Sol se muestran de manera más notable al analizar una rara enfermedad genética recesiva, el *xeroderma pigmentoso* (*XP*). Los pacientes con XP poseen un sistema de reparación deficiente que no puede remover segmentos de DNA dañados por la radiación ultravioleta. Como resultado, las personas con XP son muy sensibles a la luz solar; incluso la exposición muy limitada a los rayos directos del Sol puede ocasionar la aparición de un gran número de manchas pigmentadas de color oscuro sobre las regiones expuestas del cuerpo (fig. 1) y un riesgo elevado de desarrollar cánceres de piel fatales y desfigurantes. Para los individuos con XP es útil el uso de cremas dérmicas que contienen enzimas que reparan el DNA. Estas enzimas están contenidas en liposomas que al parecer penetran la capa externa de la piel y participan en las vías de reparación.

El XP no es el único trastorno genético caracterizado por deficiencia del sistema de reparación de la escisión de nucleótidos. El síndrome de Cockayne (CS) es una alteración hereditaria reconocible por una sensibilidad aguda a la luz, alteraciones neurológicas secundarias como la desmielinización de neuronas y anormalidades del desarrollo, aunque con incremento escaso o nulo de padecer cáncer de piel. Las células de las personas con CS son deficientes en la vía preferencial por medio de la cual se repara un DNA activo desde el punto de vista transcripcional (pág. 563). El resto del genoma se repara a una tasa normal, lo que al parecer explica por qué estos individuos no están sujetos a mayor probabilidad de cáncer dérmico. ¿Por qué las personas con deficiencias en el mecanismo de reparación están sometidas a alteraciones específicas como el enanismo? En la mayoría de los casos de CS puede encontrarse una mutación en uno de los dos genes, ya sea *CSA* o *CSB*, que participan en el acoplamiento de la transcripción a la reparación del DNA (véase fig. 13-26). Las mutaciones en estos genes, además de afectar la reparación del DNA, también pueden alterar la transcripción de ciertos genes y llevar al retraso del crecimiento y un desarrollo anormal del sistema nervioso. Esta posibilidad la apoya el hallazgo de que en algunos casos los síntomas de CS también pueden observarse en personas con XP que portan mutaciones específicas en el gen *XPD*. Como se ha señalado en la página 563, el gen *XPD* codifica a una subunidad de un factor de transcripción TFIIH requerido para el inicio de la transcripción. Las mutaciones en el gen *XPD* podrían llevar a los defectos de la reparación del DNA y la transcripción. Ciertas mutaciones en el gen *XPD* causan otra enfermedad, la tricotiodistrofia (TTD), la cual también combina síntomas sugestivos de defectos en la reparación del DNA y la transcripción. Al igual que los pacientes con CS, los individuos con TTD muestran una sensibilidad aumentada a la luz solar pero sin el riesgo incrementado de desarrollar cáncer. Los enfermos con TTD sufren síntomas adicionales que incluyen pelo quebradizo y piel con escamas. Estos hallazgos indican que los tres padecimientos distintos (XP, CS y TTD) se deben a defectos en un solo gen, con la enfermedad determinada de manera particular por las mutaciones específicas presentes en el gen. Es de suponer que esas diferentes mutaciones afectan diversas funciones de la proteína.

Las personas con alteraciones de la reparación del DNA no son los únicos individuos que deben preocuparse acerca de la exposición al Sol. Incluso en células de la piel cuyas enzimas de reparación funcionan a niveles óptimos, cierta fracción de las lesiones no se elimina ni sustituye. Las alteraciones del DNA pueden ocasionar mutaciones capaces de convertir una célula en maligna. Así, una de las consecuencias de la corrección incompleta del daño inducido por luz ultravioleta es el riesgo de cáncer de piel. Considérense las siguientes estadísticas: más de un

FIGURA 1 Son evidentes las regiones pigmentosas oscuras de la piel en este niño con xeroderma pigmentoso. El área de la piel por debajo del mentón se encuentra protegida del Sol y no muestra ninguna lesión. (KEN GREER/VISUALS UNLIMITED.)

millón de personas desarrollan una de las tres formas de cáncer cutáneo cada año en Estados Unidos y algunos de estos casos se atribuyen a la exposición excesiva a los rayos ultravioleta del Sol. Por fortuna, las dos formas más comunes de cáncer de la piel (carcinoma de células basales y carcinoma celular escamoso) rara vez se diseminan a otras partes del cuerpo y por lo general pueden eliminarse en el consultorio. Estos dos tipos de tumoración se originan en las células epiteliales de la piel.

Sin embargo, el melanoma maligno, un tercer tipo de cáncer de la piel, es un asesino potencial. A diferencia de los otros, los melanomas se desarrollan a partir de las células pigmentarias de la piel. El número de casos de melanoma diagnosticados en Estados Unidos se ha incrementado a una velocidad alarmante hasta 4% por año debido a la mayor cantidad de horas que la gente se expone al Sol en las últimas décadas. Los estudios sugieren que uno de los factores más importantes de riesgo para desarrollar melanoma en un adulto es la presencia de quemaduras solares en la infancia o la adolescencia. Es muy importante, de esta forma, prevenir tales quemaduras en la infancia.

El XP es una afección muy rara, pero el cáncer de colon es algo más común. Se ha estimado que más de 15% de los casos de cáncer de colon puede atribuirse a mutaciones de los genes que codifican las proteínas requeridas para la reparación de los apareamientos de bases erróneos. Las mutaciones que inutilizan al sistema de reparación de los apareamientos de bases erróneos llevan de modo inevitable al aumento de la frecuencia de las mutaciones de otros genes debido a que los errores cometidos durante la replicación no se corrigen.

El cáncer también es una de las consecuencias de la rotura del DNA de doble cadena no reparada, o reparada de forma incorrecta. Las roturas en el DNA pueden ser secundarias a una variedad de agentes ambientales comunes, como rayos X, rayos gamma y emisiones radiactivas. El peligro ambiental más serio es el que proviene quizá del radón (^{222}Rn), un isótopo radiactivo formado durante la desintegración del uranio. Algunas áreas del planeta contienen altos niveles de uranio en el suelo y las casas construidas en estas regiones pueden contener niveles peligrosos del gas. Cuando se inhala pueden ocasionarse daños del DNA, como la rotura de la doble cadena, que incrementan el riesgo de cáncer pulmonar. Una fracción notoria de muertes de cáncer pulmonar en los no fumadores se debe tal vez a la exposición del radón.

13.3 ENTRE LA REPLICACIÓN Y LA REPARACIÓN

La sección Perspectiva humana describe una enfermedad hereditaria (el xeroderma pigmentoso [XP]) que provoca en los pacientes una incapacidad para reparar ciertas lesiones consecutivas a la exposición a la radiación ultravioleta. Los sujetos con la forma "típica" del XP tienen un defecto en uno de los siete genes que intervienen en la reparación de la escisión de nucleótidos (pág. 563). Estos genes se designan como *XPA*, *XPB*, *XPC*, *XPD*, *XPE*, *XPF* y *XPG* y algunas de sus funciones en la NER se indican en el pie de la figura 13-26. Se ha identificado a otro grupo de individuos que, tal y como los que padecen XP, es muy susceptible a desarrollar cáncer de piel como resultado de la exposición al Sol. Sin embargo, a diferencia de las células de los pacientes que tienen XP, las células de estos sujetos poseen el mecanismo de reparación de la escisión de nucleótidos y sólo fueron un poco más sensibles a la luz ultravioleta en comparación con las células normales. Esta sensibilidad a la luz ultravioleta incrementada se reveló durante la replicación, cuando estas células producen con frecuencia cadenas hijas fragmentadas después de la radiación ultravioleta. Los sujetos de este grupo padecen una variante de XP llamada XP-V. Más adelante se vuelve a este defecto básico del XP-V.

Como se ha visto en la sección previa, las células pueden reparar una gran variedad de lesiones del DNA. Sin embargo, en ocasiones una lesión en el DNA no se repara al momento que este segmento se somete a replicación. En ciertas ocasiones, la maquinaria de replicación llega al sitio dañado en la cadena molde y permanece allí. Cuando esto sucede, algún tipo de señal emitida lleva al reclutamiento de una polimerasa especializada que es capaz de saltar la lesión.[4] Supóngase que la lesión en cuestión es un dímero de timidina (fig. 13-25) y se debe a la exposición a la radiación ultravioleta en una célula de la piel. Cuando la polimerasa de replicación (delta) alcanza el obstáculo, la enzima se remplaza de forma temporal por una polimerasa de DNA "especializada" designada como η, la cual es capaz de insertar dos residuos de A en la cadena nuevamente sintetizada enfrente de los dos residuos de T que están unidos de manera covalente como parte de un dímero. Una vez que este "salto del daño" se realiza, la célula regresa a la polimerasa de replicación normal y la síntesis de DNA continúa sin mostrar ningún signo de que un problema serio se ha resuelto. Como se ha notado, los pacientes afectados con el XP-V tienen una mutación en el gen que codifica a la polimerasa η y tienen una dificultad para reparar los pasados dímeros de timidina.

Descubierta en 1999, la polimerasa η es un miembro de una familia de polimerasas de DNA especializadas en incorporar nucleótidos de tipos opuestos en las lesiones del DNA de la cadena molde. Las polimerasas de esta familia están capacitadas en la *síntesis translesional* (*TLS*) y tienen una capacidad única para incorporar los nucleótidos que deberían estar pareados con la versión *no dañada* de la base del molde. Estas polimerasas sólo son capaces de incorporar unos cuantos nucleótidos de la cadena de DNA (carecen de la capacidad de ser procesivas), tampoco tienen la capacidad de lectura y corrección y es mucho más común que incorporen un nucleótido incorrecto (p. ej., no complementario) que las polimerasas comunes.

[4] Una célula tiene otras opciones cuando se encuentra con una situación de interrupción de la replicación, pero son más complejas, no se comprenden por completo y no se revisarán en esta obra (véase *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:943. 2005)

SINOPSIS

La replicación del DNA es semiconservadora, lo que significa que durante la división celular cada una de las células hijas recibe una mitad del dúplex original. Este mecanismo de replicación lo sugirieron por vez primera Watson y Crick como parte de su modelo de la estructura del DNA. Ellos señalaron que la replicación ocurre por la separación gradual de las cadenas debido al rompimiento de los puentes de hidrógeno, de modo que cada cadena puede servir como molde para la formación de una cadena complementaria. Pronto se confirmó

este modelo en las células bacterianas y eucariotas al demostrar que las células de una generación que se transfieren a medios marcados con radiactividad producen células hijas cuyo DNA posee una cadena marcada y una cadena no marcada (pág. 543).

El mecanismo de replicación se entiende mejor en células bacterianas. La replicación se inicia en un solo origen sobre el cromosoma bacteriano circular y procede hacia afuera en ambas direcciones como un par de horquillas de replicación. Las horquillas de replicación son sitios en los que se desenrolla la doble hélice y se incorporan nucleótidos en ambas cadenas recién sintetizadas (pág. 546).

Una familia de polimerasas de DNA cataliza la síntesis del DNA. La primera de estas enzimas que se caracterizó fue la polimerasa de DNA I de *E. coli.* Para catalizar la reacción de polimerización, la enzima requiere cuatro trifosfatos de desoxirribonucleósido, un molde de la cadena que debe copiar y un iniciador que contenga un OH 3′ libre al cual se puedan añadir nucleótidos. El iniciador es necesario porque la enzima no puede empezar la formación de una cadena de DNA. Más bien sólo es capaz de añadir nucleótidos en el extremo 3′ terminal hidroxilo de una cadena existente. Otra característica inesperada de la polimerasa de DNA I es que sólo puede polimerizar una cadena en dirección 5′ → 3′. Se presupone que las dos cadenas nuevas se sintetizarían en direcciones opuestas por polimerasas que se mueven en direcciones opuestas a lo largo de las dos cadenas progenitoras molde. Este proceso se explicó al demostrar que las dos cadenas se sintetizan de manera muy diferente (pág. 547).

Una de las cadenas recién sintetizadas (la cadena adelantada) crece en dirección de la horquilla de replicación y se sintetiza de manera continua. La otra cadena recién sintetizada (la cadena retrasada) crece y se aleja de la horquilla y se sintetiza de manera discontinua. En células bacterianas, la cadena retrasada se sintetiza como fragmentos de unos 1 000 nucleótidos de largo, denominados fragmentos de Okazaki, que se unen por enlaces covalentes entre sí mediante una ligasa de DNA. En cambio, la cadena adelantada se sintetiza como cadena simple continua. Ni la cadena continua ni los fragmentos de Okazaki pueden iniciarse por acción de la polimerasa de DNA; en vez de ello, empiezan como un iniciador de RNA corto sintetizado por un tipo de polimerasa de RNA llamado primasa. Después de ensamblar el iniciador de RNA, la polimerasa de DNA continúa la síntesis de la cadena o el fragmento como DNA. A continuación el RNA se degrada y el espacio lo ocupa DNA (pág. 548).

Los sucesos observados en la horquilla de replicación exigen una variedad de diferentes tipos de proteínas que tienen funciones especializadas. Entre tales proteínas figuran las siguientes: una girasa de DNA, que es un tipo de topoisomerasa II necesaria para liberar la tensión que se genera como resultado del desenrollamiento del DNA; una helicasa de DNA que desenrolla el DNA y separa las cadenas; proteínas que se unen de modo selectivo al DNA de cadena sencilla y evitan que se vuelvan a reconectar; una primasa, que sintetiza los iniciadores de RNA, y una ligasa de DNA que sella los fragmentos de la cadena retrasada para formar un polinucleótido continuo. La polimerasa de DNA III es la enzima que sintetiza el DNA de manera primaria y añade nucleótidos a cada iniciador de RNA, en tanto que la polimerasa de DNA I se encarga de eliminar los iniciadores de RNA y remplazarlos con DNA. Se cree que dos moléculas de polimerasa de DNA III se desplazan juntas en forma de un complejo (replisoma) a lo largo de sus respectivas cadenas molde. Esto se efectúa conforme la cadena retrasada se pliega hacia atrás sobre sí misma (pág. 550).

Las polimerasas de DNA poseen sitios catalíticos separados para la polimerización y degradación de las cadenas de ácido nucleico. La mayoría de las polimerasas de DNA tienen actividades de exonucleasa 5′ → 3′ y 3′ → 5′. La primera actúa para degradar los iniciadores de RNA de cada fragmento de Okazaki y la segunda remueve los nucleótidos inapropiados después de su incorporación errónea, lo cual contribuye a la fidelidad de la replicación. Se estima que alrededor de uno de cada 10^9 nucleótidos se incorpora de manera incorrecta durante la replicación en *E. coli* (pág. 554).

La replicación en células eucariotas sigue un mecanismo similar y emplea proteínas semejantes a las utilizadas por los procariotas. Todas las polimerasas de DNA que participan en la replicación alargan las cadenas de DNA en dirección 5′ → 3′. Ninguna de éstas inicia la síntesis de cadenas sin un iniciador. La mayoría posee una actividad de exonucleasa 3′ → 5′, lo que garantiza que la replicación ocurra con gran fidelidad. A diferencia de los procariotas, la replicación en los eucariotas se inicia de manera simultánea en muchos sitios a lo largo del cromosoma, con las horquillas de replicación hacia adelante en ambas direcciones de cada sitio de inicio. Estudios de levaduras indican que los orígenes de replicación contienen sitios de unión específica para un complejo multiproteico esencial llamado ORC. Los sucesos en el origen aseguran que la replicación de cada segmento de DNA, ocurra una vez y sólo una vez por cada ciclo celular (pág. 556).

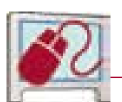
La replicación en células eucariotas se relaciona de forma estrecha con estructuras nucleares. Hay evidencia que indica que buena parte de la maquinaria requerida para la replicación se vincula con la matriz nuclear. Además, las horquillas de replicación que son activas en cualquier momento se hallan dentro de unos 50 a 250 sitios conocidos como lugares de replicación. El DNA recién sintetizado se relaciona en poco tiempo con nucleosomas. Tetrámeros $(H3H4)_2$ presentes antes de la replicación permanecen intactos y pasan a las estructuras dúplex hijas, mientras que los dímeros H2A/H2B están separados el uno del otro y se unen de modo aleatorio a los tetrámeros $(H3H4)_2$ nuevos y viejos en las dúplex hijas (pág. 560).

El DNA está expuesto a muchas influencias ambientales nocivas, entre ellas radiación ionizante, sustancias químicas comunes y radiación ultravioleta. Las células poseen diferentes sistemas para reconocer y reparar los daños resultantes. Se estima que menos de una base se modifica en mil salvamentos estructurados por los sistemas de reparación de la célula. Se conocen cuatro principales tipos de sistemas para la reparación del DNA. Los sistemas de reparación de la escisión de nucleótido (NER) funcionan al remover una pequeña sección de la cadena de DNA que contiene la lesión, como un dímero de pirimidina. Durante la NER las cadenas de DNA que alojan la lesión se separan por acción de una helicasa; una endonucleasa efectúa un par de incisiones, la abertura se llena mediante la acción de una polimerasa de DNA y una ligasa de DNA sella la cadena. La NER repara de forma preferencial las cadenas molde de genes que están bajo transcripción activa. La reparación de la escisión de bases elimina diferentes nucleótidos alterados que producen distorsiones menores en la hélice del DNA. Las células poseen una variedad de glucosilasas que reconocen y remueven diferentes tipos de bases alteradas. Una vez que las bases se remueven la porción restante del nucleótido se desplaza por medio de una endonucleasa, el espacio se elimina por medio de la acción de una fosfodiesterasa y se llena y sella mediante una polimerasa y una ligasa. La replicación de los pares de bases de apareamiento incorrecto es un mecanismo que se encarga de eliminar los nucleótidos incorrectos incorporados durante la replicación que escapan a la corrección de pruebas efectuadas por la actividad de la polimerasa. En bacterias, la cadena sintetizada de nueva cuenta se selecciona para la reparación en virtud de la falta de grupos metilo si se compara con la cadena parental. La rotura de doble cadena se repara en la forma de proteínas que se unen a ambos extremos rotos y se conectan otra vez en sus extremos (pág. 562).

Además de las polimerasas de DNA comunes que intervienen en la replicación del DNA y la reparación, las células también poseen un ordenamiento de polimerasas de DNA que facilita la replicación en sitios de lesiones del DNA o alineamientos defectuosos. Estas polimerasas, que actúan en la síntesis translesional, no tienen la procesividad y la capacidad de lectura y corrección y muestran más tendencia al error que las polimerasas típicas (pág. 567).

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. Considérese que Meselson y Stahl permitieron en sus experimentos el crecimiento de las células en medios con ^{14}N y luego las transfirieron a un medio con ^{15}N. ¿Cómo aparecerían las bandas en el tubo de centrifugación si la replicación fuera, de modo respectivo, semiconservadora, conservadora y dispersadora?
2. Suponga que aísla una cepa mutante de levadura que replica su DNA más de una vez por ciclo celular. En otras palabras, cada gen en el genoma se replicó varias veces entre divisiones celulares sucesivas. ¿Cómo explicaría este fenómeno?
3. ¿De qué forma los cromosomas del experimento de las células eucariotas mostrado en la figura 13-4 deberían aparearse si la replicación ocurre por un mecanismo conservador o dispersador?
4. Se ha señalado que las células poseen una enzima especial para remover el uracilo del DNA. ¿Qué sucedería si los grupos uracilo no se removieran? (Debe considerar la información presentada en la figura 11-44 respecto de las propiedades de apareamiento del uracilo.)
5. Dibuje una molécula de DNA de doble cadena que no sirviera como molde para la síntesis de DNA por medio de la polimerasa de DNA I.
6. Algunas bacterias mutantes sensibles a la temperatura detienen su replicación inmediatamente después de la elevación de la temperatura, pero otras continúan la replicación del DNA por un tiempo antes de suspender su actividad y otras prosiguen hasta completar un ciclo de replicación. ¿En qué aspectos difieren estos tres tipos de mutantes?
7. Si la tasa de error durante la replicación en las células humanas fuera igual que en bacterias (cerca de 10^{-9}), ¿cuál sería el efecto en los dos tipos celulares?
8. La figura 13-19 muestra los resultados de un experimento en el cual las células se incubaron con [^{3}H] timidina por menos de 30 min antes de la fijación. ¿Qué debería esperar en esta fotografía después de una hora de marcaje?, ¿es posible concluir que la replicación total del genoma se realiza en una hora?, si no es así, ¿cuál es la razón?
9. Los orígenes de replicación tienen una región muy rica en pares de bases A-T. ¿Para qué sirven estas secuencias?
10. ¿Qué ventajas cabría esperar de que la replicación del DNA ocurra en conjunto con la matriz nuclear en oposición al nucleoplasma?, ¿cuáles son las ventajas de que la replicación suceda en pocos lugares?
11. ¿Cuáles son algunas de las razones que explican por qué se esperaría que las células humanas tuvieran mecanismos de reparación más eficientes que los de las ranas?
12. Al comparar autorradiografías de dos células expuestas a [^{3}H] timidina, una se obtuvo de la replicación del DNA (fase S) y la otra no. ¿Cuál sería la diferencia entre estas autorradiografías?
13. Construya un modelo que explique cómo el DNA activo desde el punto de vista transcripcional se repara de modo preferencial en comparación con el DNA inactivo.



SITIO EN INTERNET www.wiley.com/college/karp

Las animaciones y los videos indicados en este capítulo pueden visitarse en el sitio de Cell and Molecular Biology de Karp en Internet. También hallará todas las respuestas a las preguntas analíticas recién planteadas, autoexámenes que le ayudarán a prepararse para los exámenes, y vínculos con fascinantes recursos. La sección lecturas adicionales que sigue se amplía en el sitio en Internet.

LECTURAS ADICIONALES

Alberts, B. 2003. DNA replication and recombination. *Nature* 421:431–435.

Annunziato, A. T. 2005. Split decisions: what happens to nucleosomes during DNA replication. *J. Biol. Chem.* 280:12065–12068.

Baker, T. A. & Bell, S. P. 1998. Polymerases and the replisome: Machines within machines. *Cell* 92:295–305.

Bell, S. P. & Dutta, A. 2002. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 71:333–374.

DePamphilis, M. L., et al. 2006. Regulating the licensing of DNA replication origins in metazoa. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:231–239.

Friedberg, E. C., et al. 2005. Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol. Cell* 18:499–505.

Friedberg, E. C. 2006. The eureka enzyme: the discovery of DNA polymerase. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 7:143–147.

Hales, B. F. 2005. DNA repair disorders causing malformations. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 15:234–240.

Johnson, A. & O'Donnell, M. 2005. Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu. Rev. Biochem.* 74:283–315.

Kornberg, A. 2003. Ten commandments of enzymology, amended. *Trends Biochem. Sci.* 28:515–517.

Kunkel, T. 2004. DNA replication fidelity. *J. Biol. Chem.* 279:16895–16898.

Kunkel, T. A. & Erie, D. A. 2005. DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem.* 74:681–710.

Machida, Y. J., et al. 2005. Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans. *Cell* 123:13–24.

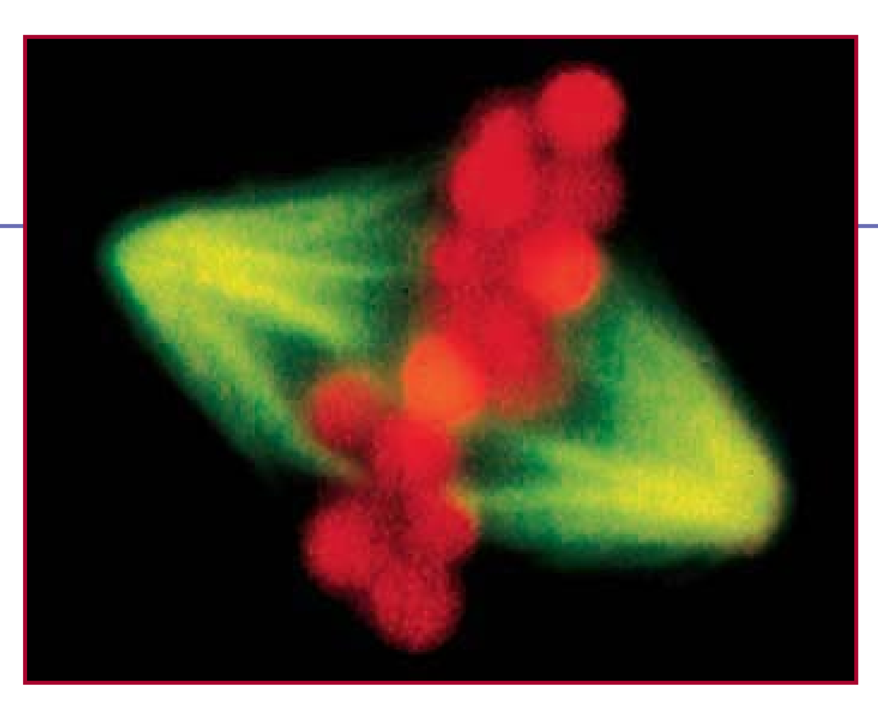
Meister, P., et al. 2006. In and out of the replication factory. *Cell* 125:1233–1235.

O'Donnell, M. & Kuriyan, J. 2006. Clamp loaders and replication initiation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16:35–41.

Spivak, G. 2004. The many faces of Cockayne syndrome. *PNAS* 101:15273–15274.

Stillman, B. 2005. Origin recognition and the chromosome cycle. *FEBS Lett.* 579:877–884.

CAPÍTULO 14



Reproducción celular

De acuerdo con la tercera doctrina de la teoría celular, las células nuevas sólo se originan de otras células vivas. El proceso por el que esto ocurre se llama **división celular**. Para un organismo pluricelular, como un humano o un roble, innumerables divisiones de un cigoto unicelular producen un organismo de complejidad y organización celular impresionantes. La división celular no se detiene con la formación del organismo maduro sino que en ciertos tejidos continúa durante toda la vida. Millones de células que se encuentran dentro de la médula de los huesos o en el recubrimiento del intestino de cualquier ser humano están dividiéndose en este momento. Esta enorme producción celular es necesaria para reponer las células viejas o muertas.

Aunque la división celular ocurre en todos los organismos, ésta se lleva a cabo de manera muy diferente en los procariotas y en los eucariotas. La descripción de este capítulo se limita a la versión eucariota y se tratan dos tipos distintos de división celular eucariota. La mitosis que conduce a la producción de células con características genéticas idénticas a las de su antecesora, mientras que en la meiosis se producen células con la mitad del contenido genético de la célula madre. La mitosis sirve de base para producir células nuevas, mientras que la meiosis es la base para producir nuevos organismos con reproducción sexual. Estos dos tipos de división celular juntos forman los eslabones de la cadena entre los padres y sus descendientes y, en un sentido más amplio, entre las especies vivas y las primeras formas de vida eucariota en la Tierra.

Micrografía con fluorescencia de un huso mitótico que se ensambló en un extracto libre de células, preparado a partir de huevos de rana, que son células que carecen de centrosoma. Las esferas rojas son cuentas cubiertas con cromatina que se agregaron al extracto. En esta micrografía resulta evidente que un huso bipolar puede ensamblarse en ausencia de cromosomas y centrosomas. (REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE R. HEALD, ET AL. NATURE VOL. 382, PORTADA DE 8/I/96; © DERECHOS RESERVADOS 1996, MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)

14.1 EL CICLO CELULAR

En una población de células en división, ya sea dentro del cuerpo o en una caja de cultivo, cada célula pasa por una serie de etapas definidas que constituyen el **ciclo celular** (fig. 14-1). El ciclo celular puede dividirse en dos fases principales con base en las actividades celulares visibles con un microscopio óptico: la fase M y la interfase. La **fase M** incluye: 1) el proceso de **mitosis**, durante el cual los cromosomas duplicados se separan en dos núcleos, y 2) la **citocinesis**, en la que toda la célula se divide en dos células hijas. La **interfase** es el periodo entre las divisiones celulares, es un intervalo donde la célula crece y efectúa diversas actividades metabólicas. Mientras que la fase M sólo suele durar alrededor de 1 h en las células de mamíferos, la interfase puede extenderse por días, semanas o más tiempo, según el tipo celular y las condiciones imperantes.

Aunque la fase M es el periodo en que el contenido de la célula se divide en realidad, durante la interfase ocurren muchos preparativos para la mitosis próxima, inclusive la replicación del DNA (ácido desoxirribonucleico) celular. Podría suponerse que la célula realiza la replicación durante la interfase, pero estudios efectuados en el decenio de 1950 respecto a cultivos asincrónicos (cultivos cuyas células están distribuidas al azar en distintos momentos del ciclo celular) mostraron que no es así. Como se describe en el capítulo 13, la replicación del DNA puede seguirse mediante la incorporación de [^{3}H]timidina al DNA recién sintetizado. Si se aplica [^{3}H]timidina a un cultivo celular durante un periodo corto (p. ej., 30 min) y una muestra de la población celular se fija, se seca en un portaobjetos y se examina mediante autorradiografía, se observa que sólo una fracción de las células tiene núcleos radiactivos. Entre las células que realizaban la mitosis en el momento de la fijación (como se demuestra por sus cromosomas compactos) no se encontró ninguna con radiactividad nuclear. Estas células mitóticas tienen cromosomas sin marca porque no experimentaban la replicación del DNA durante el periodo de marcado.

Tampoco se encuentran células con cromosomas mitóticos marcados si se permite que el proceso de marcado continúe durante una o varias horas antes de tomar la muestra de las células (fig. 14-2). Con estos resultados puede concluirse que hay un periodo definido entre el final de la síntesis de DNA y el principio de la fase M. Este periodo se denomina G_2 (por segunda brecha, *gap* en inglés). La duración de G_2 se descubre al continuar el muestreo celular del cultivo hasta encontrar cromosomas mitóticos marcados. Las primeras células con cromosomas mitóticos marcados debieron estar en las últimas etapas de la síntesis del DNA al principio de la incubación con [^{3}H] timidina. La duración del intervalo entre el comienzo del periodo de marcado y la aparición de células con figuras mitóticas marcadas corresponde a la duración de G_2.

La duplicación del DNA ocurre durante un periodo del ciclo celular llamado **fase S**. La fase S también es el periodo en el que la célula sintetiza las histonas adicionales que se necesitarán cuando la célula duplique el número de nucleosomas en sus cromosomas (véase fig. 13-24). La duración de la fase S puede determinarse en forma directa. En un cultivo asincrónico, el

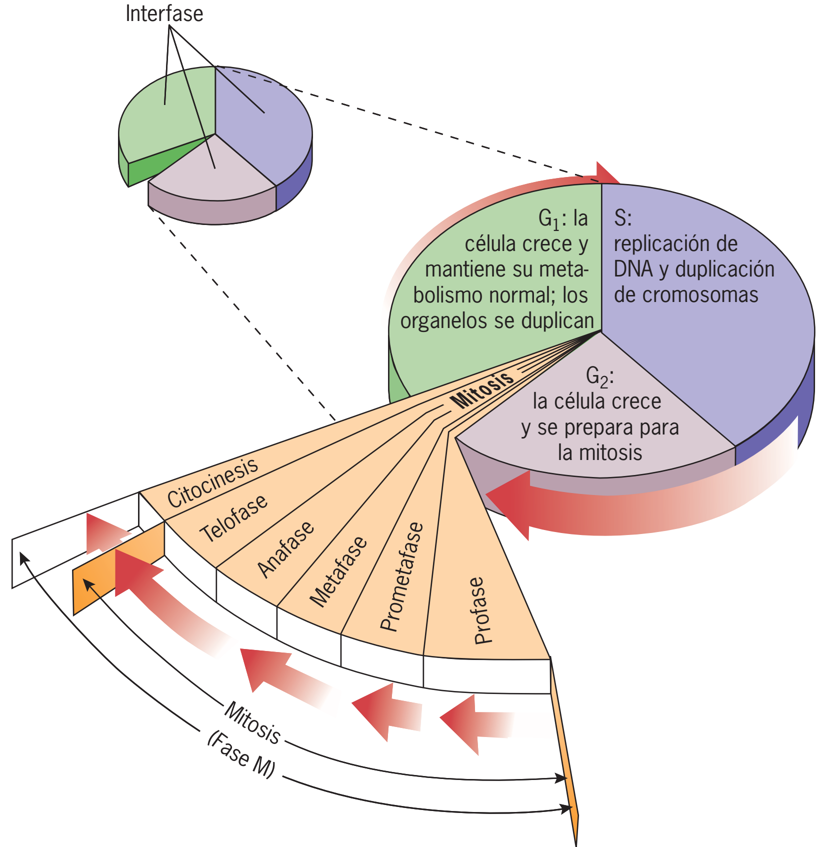


FIGURA 14-1 Una revisión del ciclo celular eucariota. Este diagrama del ciclo celular indica las etapas por las que una célula pasa de una división a la siguiente. El ciclo celular se divide en dos fases principales: fase M e interfase. La fase M incluye los fenómenos sucesivos de la mitosis y la citocinesis. La interfase se divide en fases G_1, S y G_2; la fase S es equivalente al periodo de síntesis de DNA. La división de la interfase en tres fases separadas con base en el momento de la síntesis de DNA fue propuesta inicialmente en 1953 por Alma Howard y Stephen Pelc del *Hammersmith Hospital*, Londres, a partir de sus experimentos con células del meristemo (vegetales).

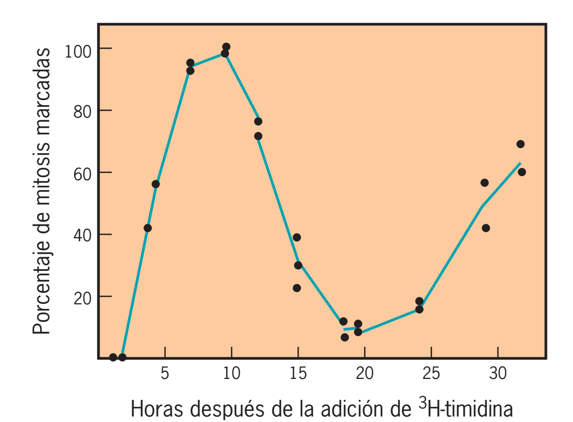


FIGURA 14-2 Resultados experimentales que demuestran que la replicación ocurre durante un periodo definido del ciclo celular. Se cultivaron células HeLa durante 30 min en un medio que contenía [^{3}H]timidina y luego se incubaron (siguieron) por periodos diversos en un medio sin marca antes de fijarlas y prepararlas para la autorradiografía. Cada caja de cultivo se exploró en busca de células que estuvieran en mitosis al momento de fijarlas y se trazó la gráfica del porcentaje de las células cuyos cromosomas estaban marcados. (Tomada de un estudio de R. Baserga y F. Wiebel.)

porcentaje de células que realizan una actividad particular es una medida aproximada del porcentaje de tiempo que esta actividad ocupa en la vida de las células. Por tanto, si la duración del ciclo celular completo se conoce, la duración de la fase S puede calcularse a partir del porcentaje de células cuyos núcleos adquieren marcas radiactivas durante un breve pulso con [^{3}H]timidina. De igual manera la duración de la fase M puede calcularse a partir del porcentaje de células de la población que realizan mitosis o citocinesis. Cuando los periodos G_2 + S + M se suman, es evidente que hay un periodo adicional en el ciclo celular que aún debe explicarse. Esta otra pausa, llamada G_1 (por primera brecha, *gap*) es el periodo siguiente a la mitosis y previo a la síntesis del DNA.

Ciclos celulares in vivo

Una de las propiedades que distingue los diversos tipos de células dentro de una planta o animal es su capacidad para crecer y dividirse. Se reconocen tres categorías celulares amplias:

1. ***Células, como las nerviosas, musculares o eritrocitos, que son muy especializadas y carecen de la capacidad para dividirse.*** Una vez que estas células se diferencian, permanecen en ese estado hasta que mueren.
2. ***Células que no se dividen en condiciones normales, pero que pueden inducirse para iniciar la síntesis de DNA y dividirse cuando reciben el estímulo apropiado.*** Este grupo incluye las células hepáticas, que pueden estimularse para que proliferen mediante la extirpación quirúrgica de una parte del hígado, y los linfocitos, cuya proliferación puede inducirse por interacción con algún antígeno apropiado.
3. ***Células que tienen un nivel relativamente alto de actividad mitótica en condiciones normales.*** Ciertos tejidos del cuerpo mantienen una renovación continua, con formación constante de nuevas células por división celular. Esta categoría comprende las espermatogonias que dan origen a los gametos masculinos, las células primordiales hemopoyéticas que producen glóbulos rojos y blancos, y las células de la base de muchos epitelios que recubren las cavidades corporales y la superficie del cuerpo. Las células hasta cierto punto no especializadas del meristemo apical que se localiza cerca de las puntas de las raíces y los tallos vegetales también muestran una división celular rápida y continua.

La duración de los ciclos celulares varía desde 30 min en un embrión de rana que se divide y cuyas células carecen de fases G_1 y G_2, hasta varios meses en los tejidos de crecimiento lento, como el hígado de los mamíferos. Con unas cuantas excepciones notables, las células que dejaron de dividirse, ya sea en forma temporal o permanente, en el cuerpo o en un cultivo, se encuentran en una etapa previa al inicio de la síntesis de DNA. Se dice que las células que se detienen en tal estado (que abarca la mayoría de las células del cuerpo) se encuentran en el estado G_0 para distinguirlas de las células en la fase G_1 típica que pronto podrían entrar en la fase S. Como se explica adelante, una célula debe generar una señal interna para pasar de la fase G_0 o G_1 a la fase S. Una vez que la señal para iniciar la replicación del DNA se produce, la célula siempre completa la ronda de síntesis de DNA y continúa a través de la mitosis.

Control del ciclo celular

El estudio del ciclo celular no sólo es importante para la biología celular, también tiene enormes implicaciones prácticas para combatir el cáncer, una enfermedad ocasionada por la pérdida de la capacidad de una célula para regular su propia división. Una serie de experimentos de fusión celular realizados por Potu Rao y Robert Johnson de la *University of Colorado* en 1970 abrió el camino para comprender cómo se regula el ciclo celular.

Rao y Johnson querían saber si el citoplasma de las células contiene factores reguladores que afectan las actividades del ciclo celular. Abordaron esta pregunta con la fusión de células de mamíferos que estaban en diferentes etapas del ciclo celular. En un experimento, fusionaron células en G_1 con células en la fase S y formularon la siguiente pregunta: ¿el citoplasma donado por la célula G_1 sin replicación contiene factores que bloquean la replicación del DNA en el núcleo que se encuentra en fase S, o el citoplasma de la célula en fase S contiene factores que estimulan la replicación de DNA en el núcleo que se encuentra en fase G_1? Encontraron que el núcleo de la célula híbrida que provenía de la célula en fase G_1 se activaba con el citoplasma de fase S para iniciar la replicación. Estos resultados sugerían que el citoplasma de una célula en replicación contiene factores capaces de difundirse que estimulan el inicio de la síntesis de DNA en los núcleos que se encontraban en fase G_1. En cambio, los núcleos en fase G_2 no iniciaban otra ronda de síntesis de DNA cuando se fusionaban células en fase G_2 y en fase S. Esta observación sugirió que los núcleos en fase G_2, que ya replicaron el DNA, no pueden responder más a los factores de iniciación presentes en el citoplasma de la célula en fase S. La base de este hallazgo puede verse en la figura 13-20; el comienzo de la replicación requiere el ensamble de un complejo previo a la replicación, que sólo puede ocurrir al principio de la fase G_1.

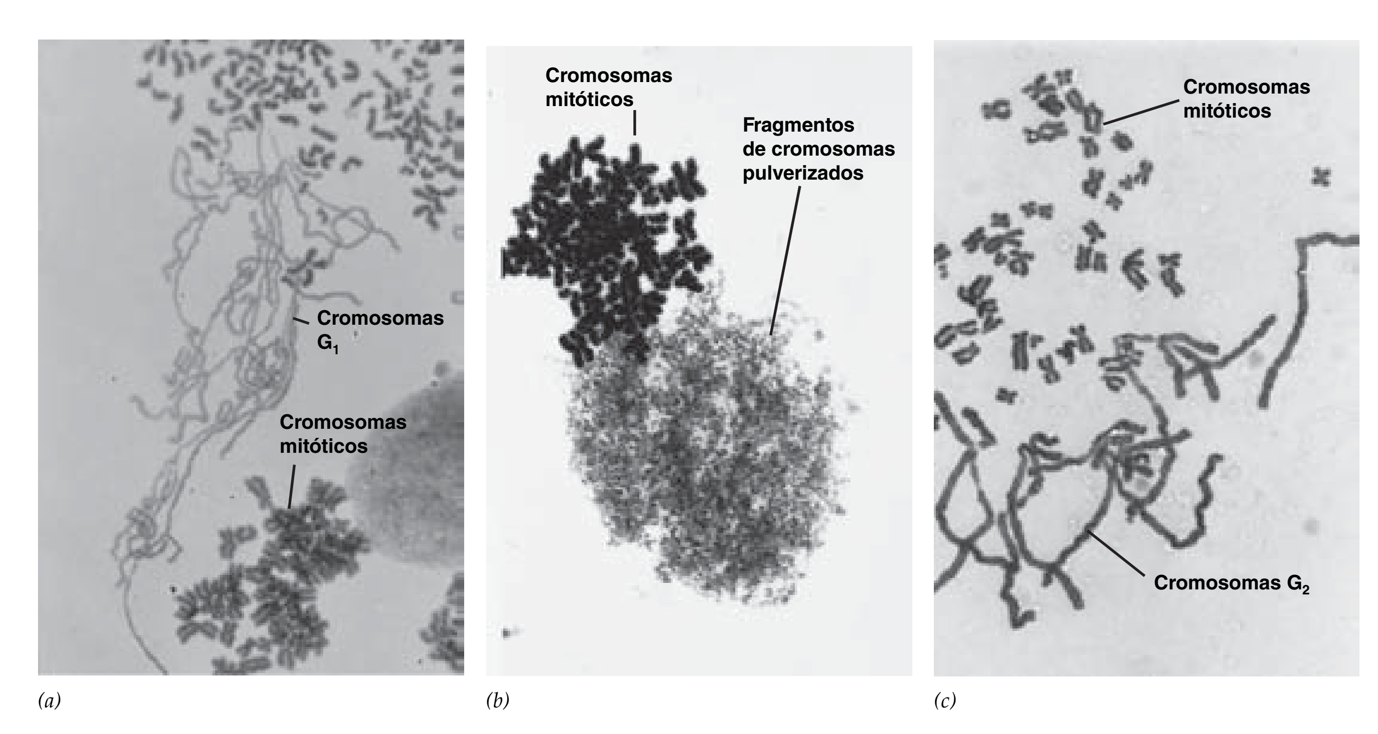


FIGURA 14-3 Demostración experimental de que las células contienen factores que estimulan el inicio de la mitosis. Las fotografías muestran los resultados de la fusión de una célula HeLa en fase M con una célula PtK2 de rata canguro que estaba en (*a*) fase G_1, (*b*) fase S o (*c*) fase G_2 al momento de la fusión celular. Como se describe en el texto, la cromatina de las células PtK2 en fase G_1 y en fase G_2 se somete a compactación prematura, mientras que la de la célula en fase S se pulveriza. Las cromátides alargadas de la célula en fase G_2 en (*c*) son el doble en comparación con las de la célula G_1 en (*a*). (Tomada de Karl Sperling y Potu N. Rao, Humangenetik 23:437, 1974.)

Los resultados de otros experimentos de fusión celular sugirieron que la transición de G_2 a M también se induce por factores citoplásmicos. Por ejemplo, cuando se fusionaron células mitóticas con células que estaban en otras etapas del ciclo celular, la célula mitótica siempre inducía la compactación de cromatina en el núcleo de la célula no mitótica (fig. 14-3). Si se fusionaba una célula en fase G_1 con otra en fase M, la cromatina del núcleo en fase G_1 presentaba *compactación cromosómica prematura* para formar un conjunto de cromosomas compactados alargados (fig. 14-3*a*). Si se fusionaba una célula en fase M con una en fase G_2, los cromosomas también presentaban compactación cromosómica prematura pero, a diferencia de los del núcleo G_1, los cromosomas compactados G_2 se veían duplicados, lo que reflejaba el hecho de que la replicación ya había ocurrido (fig. 14-3*c*). Si se fusionaba una célula mitótica con una célula en fase S, la cromatina de la fase S también se compactaba (fig. 14-3*b*). Sin embargo, el DNA en replicación es muy sensible al daño, por lo que la compactación del núcleo en fase S conducía a la formación de fragmentos cromosómicos "pulverizados" en lugar de cromosomas compactos intactos. El conjunto de los resultados de estos experimentos sugirió que las transiciones de G_1 a S y de G_2 a M estaban bajo un control positivo, o sea, que ambos cambios se debían a la presencia de algún agente estimulante.

La función de las proteincinasas Aunque los experimentos de fusión celular revelaron la existencia de factores que regulan el ciclo celular, éstos no brindaron información respecto a las propiedades bioquímicas de esos factores. Los primeros indicios acerca de la naturaleza de los agentes que inician la replicación del DNA y promueven el ingreso de la célula a la mitosis (o meiosis) se obtuvieron en una serie de experimentos con oocitos y embriones jóvenes de ranas e invertebrados. Estos experimentos se describen en la sección Vías experimentales al final de este capítulo. En resumen, se demostró que la entrada de una célula en la fase M se inicia por una proteína llamada *factor promotor de maduración* (*MPF*). El MPF tiene dos subunidades: 1) una subunidad con actividad de cinasa que transfiere grupos fosfato del ATP a residuos específicos de serina y treonina de sustratos proteicos específicos y 2) una subunidad reguladora llamada *ciclina.* El término "ciclina" se acuñó porque la concentración de esta proteína reguladora se eleva y disminuye con un patrón predecible en cada ciclo celular (fig. 14-4). Cuando la concentración de ciclina es baja, la cinasa carece de la subunidad ciclina y como resultado permanece inactiva. Si la concentración de ciclina se eleva, la cinasa se activa, lo que hace que la célula ingrese en la fase M. Estos resultados sugirieron que: 1) la progresión de las células a la mitosis depende de una enzima cuya única actividad es fosforilar otras proteínas y 2) que la actividad de esta enzima está controlada por una subunidad cuya concentración varía de una etapa a otra del ciclo celular.

En los últimos 20 años muchos laboratorios se enfocaron en las enzimas similares al MPF llamadas **cinasas dependientes de ciclina** (**Cdk**). Se descubrió que las Cdk no sólo participan

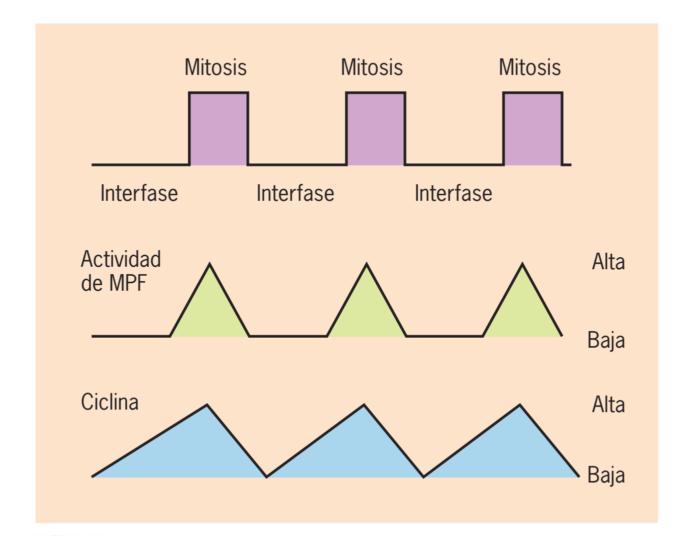


FIGURA 14-4 Fluctuación de los niveles de ciclina y MPF durante el ciclo celular. Este dibujo ilustra los cambios cíclicos que ocurren durante el desarrollo temprano de la rana, cuando las divisiones mitóticas son rápidas y sincrónicas en todas las células del embrión. El trazo superior muestra la alternancia entre los periodos de mitosis e interfase; el trazo intermedio ilustra los cambios cíclicos en la actividad del MPF, y el trazo inferior, los cambios cíclicos en las concentraciones de las ciclinas que controlan la actividad relativa de la proteincinasa del MPF. (Reimpresa con autorización de A. W. Murray y M. W. Kirschner, Science 246:616, 1989; © derechos reservados 1989; American Association for the Advancement of Science.)

en la fase M, sino que son agentes clave que dirigen las actividades durante todo el ciclo celular. Las células de levaduras son muy útiles en los estudios del ciclo celular, cuando menos en parte por la disponibilidad de mutantes sensibles a la temperatura cuyas proteínas anormales afectan varios procesos del ciclo celular. Como se explica en la página 546, los mutantes sensibles a la temperatura pueden crecer de manera más o menos normal en una temperatura menor (permisiva) y luego cambiarse a una temperatura más alta (restrictiva) para estudiar el efecto del producto del gen mutante. Los investigadores que estudian el control genético del ciclo celular se enfocan en dos especies de levaduras con una relación lejana, la levadura con gemación *Saccharomyces cerevisiae*, que se reproduce mediante gemación en un extremo de la célula (véase fig. 1-18*b*), y una levadura que se reproduce por fisión, *Schizosaccharomyces pombe*, que para reproducirse se alarga y luego se divide en dos células de igual tamaño (véase fig. 14-6). La base molecular de la regulación del ciclo celular se conservó en forma notable durante la evolución de los eucariotas. Una vez que un gen participante en el control del ciclo celular se identifica en una de las dos especies de levaduras, se buscan homólogos (y casi siempre se encuentran) en los genomas de los eucariotas superiores, inclusive los humanos. La combinación de los análisis genéticos, bioquímicos y estructurales facilita a los investigadores la comprensión de las principales actividades que permiten a una célula crecer y reproducirse en una caja de cultivo en un laboratorio.

La investigación del control genético del ciclo celular en las levaduras comenzó en el decenio de 1970 en dos laboratorios: primero en el de Leland Hartwell en la *Washington University*, que trabajaba con levaduras con gemación, y luego en el de Paul Nurse de la *Oxford University* que trabajaba en levaduras con fisión. Ambos laboratorios identificaron un gen que al mutar inducía el crecimiento de las células en una temperatura elevada para detenerse en ciertos puntos del ciclo celular. Al final se encontró que el producto de este gen, que se llamó *cdc2* en las levaduras con fisión (y *CDC28* en las levaduras con gemación), era homólogo a la subunidad catalítica del MPF; en otras palabras, era una cinasa dependiente de ciclina. La investigación posterior con levaduras y muchas células de vertebrados apoyó el concepto de que la progresión de una célula eucariota por el ciclo celular está regulada en distintas etapas. Una de las primeras etapas de regulación ocurre cerca del final de G_1 y otra cerca del final de G_2. Estas etapas representan puntos del ciclo celular en los que la célula se ocupa del principio de un fenómeno crucial, el inicio de la replicación o el de la mitosis.

A favor de la simplicidad, la discusión de este capítulo se enfoca en las levaduras con fisión. En esta especie el mismo Cdk (cdc2) es la molécula que se encarga del paso por ambos puntos de compromiso, aunque en conjunto con diferentes ciclinas. La figura 14-5 muestra una representación simplificada de la regulación del ciclo celular en la levadura con fisión. El primer punto de transición, llamado START, ocurre antes del final de G_1. Una vez que la célula pasó START, está destinada en forma irrevocable a replicar su DNA y, al final, a completar el ciclo celular.[1] El paso por START requiere la activación de cdc2 por una o más *ciclinas* G_1, cuyos niveles se elevan durante el final de G_1 (fig. 14-5). La activación de cdc2 por estas ciclinas conduce al inicio de la replicación en sitios en los que complejos de replicación se ensamblaron antes (véase paso 3, fig. 13-20).

El paso de G_2 a la mitosis requiere la activación de cdc2 por un grupo diferente de ciclinas, las *ciclinas mitóticas*. Las Cdk que contienen una ciclina mitótica (p. ej., MPF descrito en la página 610) fosforilan los sustratos necesarios para que la célula inicie la mitosis. Entre los sustratos se incluyen las proteínas necesarias para los cambios dinámicos en la organización de los cromosomas y el citoesqueleto que caracterizan el paso de la interfase a la mitosis. Las células establecen un tercer compromiso durante la parte media de la mitosis que determina si completan la división celular y reingresan a G_1 del siguiente ciclo. La salida de la mitosis con ingreso a G_1 depende de un descenso rápido en la actividad de Cdk, que es consecuencia de una caída en la concentración de las ciclinas mitóticas (fig. 14-5), un fenómeno que se explica en la página 590 junto con otras actividades mitóticas.

A menudo las cinasas dependientes de ciclinas se describen como las "máquinas" que impulsan el ciclo celular por sus diversas etapas. Las actividades de estas enzimas están reguladas por diversos "frenos" y "aceleradores" que operan en combinación. Éstos comprenden:

[1] Las células de los mamíferos pasan por un punto comparable durante la etapa G_1 conocido como *punto de restricción*, momento en el que se comprometen a la replicación del DNA y por último a completar la mitosis. Antes del punto de restricción las células de mamíferos requieren la presencia de factores de crecimiento en el medio de cultivo para progresar en el ciclo celular. Luego de pasar por el punto de restricción, estas mismas células continúan por el resto del ciclo celular sin estimulación externa.

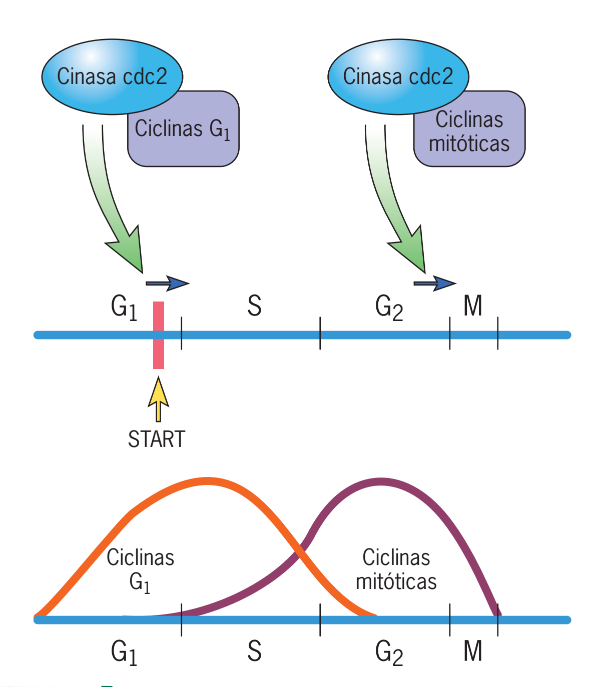


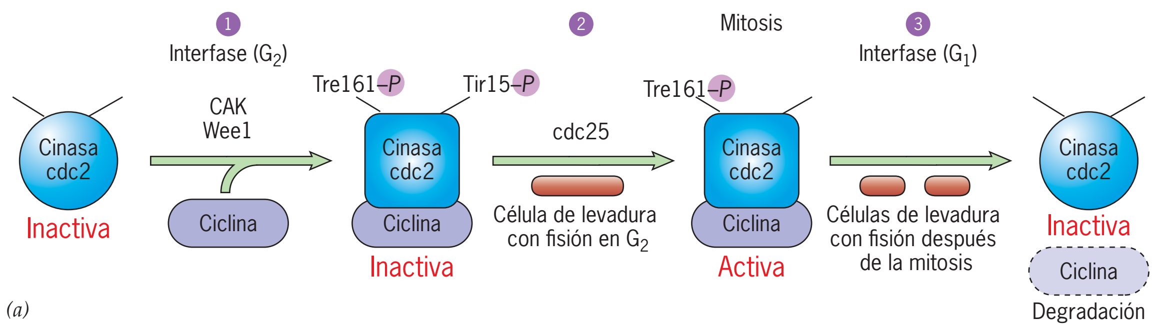
FIGURA 14-5 **Modelo simplificado para la regulación del ciclo celular en la levadura con fisión.** El ciclo celular está controlado sobre todo en dos puntos, START y la transición G_2-M. En la levadura con fisión las ciclinas pueden dividirse en dos grupos: ciclinas G_1 y ciclinas mitóticas. El paso de la célula por estas dos transiciones críticas requiere la activación de la misma proteincinasa de cdc2 por un tipo distinto de ciclina. Una tercera transición crucial ocurre al final de la mitosis y se desencadena por un descenso rápido en la concentración de ciclinas mitóticas. (Nota: cdc2 también se conoce como Cdk1.)

Unión de ciclina Cuando una ciclina está presente en la célula, se une con la subunidad catalítica de Cdk, lo que ocasiona un cambio importante en la conformación de la subunidad catalítica. Las estructuras cristalográficas por rayos X de varios complejos ciclina-Cdk indican que la unión con la ciclina produce el movimiento de un asa flexible de la cadena polipeptídica de Cdk para alejarse de la abertura que conduce al sitio activo de la enzima, lo que permite que Cdk fosforile sus sustratos proteicos.

Estado de fosforilación de Cdk En otros capítulos se explicó que la adición y la eliminación de grupos fosfato de las proteínas regulan muchos fenómenos que tienen lugar en la célula. Lo mismo sucede con los eventos que inician la mitosis. En la figura 14-5 puede verse que el nivel de ciclinas mitóticas se eleva durante las fases S y G_2. Las ciclinas mitóticas presentes en la levadura durante este periodo se unen con Cdk para formar un complejo ciclina-Cdk, pero el complejo muestra poca evidencia de actividad de cinasa. Más adelante, en una etapa tardía de G_2, el complejo ciclina-Cdk se activa y la mitosis se desencadena. Para comprender este cambio en la actividad de Cdk debe revisarse la actividad de las otras tres enzimas reguladoras: dos cinasas y una fosfatasa. La función de estas enzimas en el ciclo de la levadura con fisión, que se ilustra en la figura 14-6*a*, se reveló mediante una combinación de análisis genéticos y bioquímicos. En el paso 1, una de las cinasas, llamada CAK (cinasa activadora de Cdk, por sus siglas en inglés), fosforila un residuo crítico de treonina (Tre 161 de cdc2 en la fig. 14-6*a*). La fosforilación de este residuo es necesaria, pero no suficiente, para que Cdk se active. Una segunda proteincinasa que se muestra en el paso 1 y se denomina Wee1, fosforila un residuo clave de tirosina en la enzima (Tir 15 de cdc2 en la figura 14-6*a*). Si este residuo se fosforila, la enzima permanece inactiva sin importar el estado de fosforilación de cualquier otro residuo. En otras palabras, el efecto de Wee1 rebasa el efecto de CAK, lo que mantiene Cdk en un estado inactivo. La línea 2 de la figura 14-6*b* muestra el fenotipo de las células con un gen *wee1* mutante. Estos mutantes no pueden mantener Cdk en estado inactivo y se dividen en etapas tempranas del ciclo celular, lo que produce células más pequeñas, de ahí el nombre "wee" (diminutivo en inglés). En las células normales (tipo nativo), Wee1 mantiene Cdk inactiva hasta el final de G_2. Entonces, al final de G_2, el fosfato inhibidor de Tir 15 se retira por acción de la tercera enzima, una fosfatasa llamada Cdc25 (paso 2, fig. 14-6*a*). La eliminación de este fosfato cambia las moléculas ciclina-Cdk almacenadas a su estado activo, lo que impulsa la célula de levadura a la mitosis. La línea 3 de la figura 14-6*b* muestra el fenotipo de las células con un gen *cdc25* mutante. Estos mutantes no pueden retirar el fosfato inhibidor de Cdk y no pueden iniciar la mitosis. El equilibrio entre las actividades de la cinasa Wee1 y la fosfatasa Cdc25, que en condiciones normales determina si la célula permanece en G_2 o avanza a la mitosis, está regulado por otras cinasas y fosfatasas adicionales. Como se explica un poco más adelante, estas vías pueden detener a la célula para que no inicie la mitosis bajo condiciones que conducirían a una división celular anormal.

Inhibidores de Cdk Diversos inhibidores pueden bloquear la actividad de Cdk. Por ejemplo, en las levaduras con gemación una proteína llamada Sic1 actúa como inhibidor de Cdk durante G_1. La degradación de Sic1 permite que los complejos ciclina-Cdk presentes en la célula inicien la replicación de DNA. En la página 579 se describe la participación de los inhibidores de Cdk en las células de mamíferos.

Proteólisis controlada En las figuras 14-4 y 14-5 resulta evidente que las concentraciones de ciclina oscilan durante cada ciclo celular, lo que produce cambios en la actividad de las Cdk. Las células regulan la concentración de ciclinas y otras proteínas clave del ciclo celular mediante el ajuste tanto de la síntesis como de la velocidad de destrucción de la molécula en diferentes puntos del ciclo celular. La degradación se logra por la vía de la ubiquitina-proteosoma descrita en la página 577. A diferencia de otros mecanismos que controlan la actividad de Cdk, la degradación es un proceso irreversible que ayuda a impulsar el ciclo celular en un solo sentido. La regulación del ciclo celular requiere dos clases de complejos con múltiples subunidades (complejos SCF y APC) que funcionan como *ligasas de ubiquitina.* Estos complejos reconocen las proteínas que se van a degradar y las unen a una cadena de poliubiquitina, lo que asegura su destrucción en un proteosoma. El complejo SCF se encuentra activo desde el final de G_1 hasta la parte temprana de la mitosis (véase fig. 14-26*a*) y media la destrucción de las ciclinas G_1, los inhibidores de Cdk y otras proteínas del ciclo celular. Estas



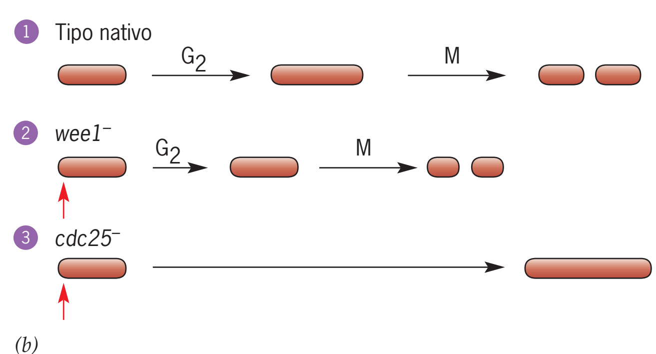


FIGURA 14-6 La progresión por el ciclo celular de una levadura con fisión requiere la fosforilación y la desfosforilación de residuos críticos de cdc2. *a*) Durante la fase G_2, la proteincinasa cdc2 interactúa con una ciclina mitótica, pero permanece inactiva como resultado de la fosforilación de un residuo clave de tirosina (Tir 15 en la levadura con fisión) por efecto de Wee1 (paso 1). Una cinasa separada, llamada CAK, transfiere un fosfato a otro residuo (Tre 161), que es necesario para la actividad de la proteincinasa cdc2 más adelante en el ciclo celular. Cuando la célula alcanza un tamaño crítico, se activa una enzima llamada fosfatasa de Cdc25, que retira el fosfato inhibidor del residuo Tir 15. La activación consecuente de la proteincinasa cdc2 conduce a la célula a la mitosis (paso 2). Para el final de la mitosis (paso 3), el grupo fosfato estimulante de Tre 161 se retira por acción de otra fosfatasa. Después la ciclina libre se degrada y la célula inicia otro ciclo. (La Cdk mitótica en las células de los mamíferos se fosforila y desfosforila en forma similar.) *b*) La proteincinasa Wee1 y la fosfatasa Cdc25 se identificaron mediante el estudio de mutantes que se comportaban como se muestra en esta figura. La línea 1 ilustra las etapas G_2 y M de una célula nativa. La línea 2 muestra el efecto de un gen *wee1* mutante; la célula se divide en forma prematura, con lo que se forman células pequeñas (*wee*, en inglés). La línea 3 muestra el efecto de un gen cdc25 mutante; la célula no se divide, sino que continúa creciendo. La flecha roja marca el momento en que la temperatura se elevó para desactivar la proteína mutante. (*A*, TOMADA DE T. R. COLEMAN Y W. G. DUNPHY, CURR OPIN CELL BIOL 6:877, 1994.)

proteínas se convierten en blancos para un SCF después que se fosforilan por acción de las proteincinasas (esto es, Cdk) que regulan el ciclo celular. Las mutaciones que inhiben la mediación de los complejos SCF en la proteólisis de las proteínas clave, como las ciclinas G_1 o el inhibidor Sic1 ya mencionado, pueden impedir que las células repliquen su DNA. El complejo APC actúa en la mitosis y degrada varias proteínas clave de la mitosis, entre ellas las ciclinas mitóticas. La destrucción de las ciclinas mitóticas permite a la célula salir de la mitosis e iniciar un nuevo ciclo celular (pág. 590).

Localización subcelular La célula contiene varios compartimientos distintos en los que las moléculas reguladoras pueden unirse o separarse de las proteínas con las que interactúan. La localización subcelular es un fenómeno dinámico en el que los reguladores del ciclo celular se mueven a distintos compartimientos en diferentes etapas. Por ejemplo, una de las principales ciclinas mitóticas de las células animales (ciclina B1) se desplaza entre el núcleo y el citoplasma hasta G_2, cuando se acumula en el núcleo justo antes del inicio de la mitosis (fig. 14-7). La acumulación nuclear de ciclina B1 se facilita por la fosforilación de un cúmulo de residuos de serina que se encuentran en su señal de exportación nuclear (NES, pág. 491). Se supone que la fosforilación bloquea la exportación posterior de la ciclina de regreso al citoplasma. Si la acumulación nuclear de la ciclina se bloquea, las células no inician la división celular.

Como ya se mencionó, las proteínas y los procesos que controlan el ciclo celular están muy bien conservados entre los euca-

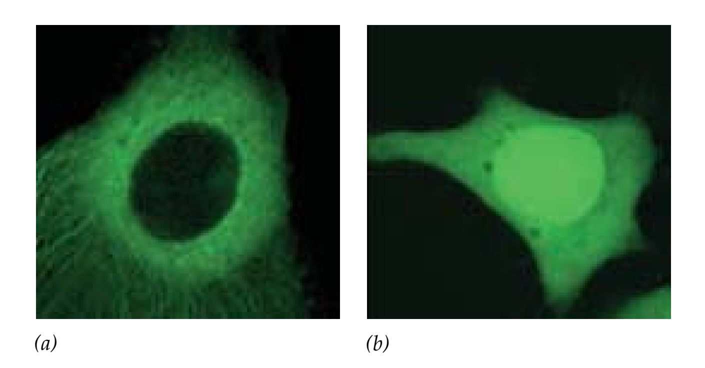


FIGURA 14-7 Demostración experimental de la localización subcelular durante el ciclo celular. Micrografías de una célula HeLa viva a la que se le inyectó ciclina B1 unida con proteína verde fluorescente (pág. 278). La célula que se muestra en (*a*) está en fase G_2 de su ciclo celular y la ciclina B1 con marca fluorescente se localiza casi por completo en el citoplasma. La micrografía (*b*) muestra la célula en la profase de la mitosis y la ciclina B1 marcada se concentra en el núcleo celular. La base para este cambio en la localización se explica en el texto. (TOMADA DE PAUL CLUTE Y JONATHAN PINES, NATURE CELL BIOL 1:83, 1999; © DERECHOS RESERVADOS 1999, MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)

riotas. Como en las levaduras, las oleadas sucesivas de síntesis y degradación de las distintas ciclinas desempeñan una función clave en la conducción de las células de los mamíferos de una etapa a la siguiente. A diferencia de las células de levaduras, que tienen una sola Cdk, las células de mamíferos producen varias versiones distintas de esta proteincinasa. Diversos complejos ciclina-Cdk actúan en distintos grupos de sustratos en diferentes puntos del ciclo celular. El emparejamiento entre ciclinas individuales y las Cdk es muy específico, y sólo se encuentran ciertas combinaciones (fig. 14-8). Por ejemplo, en las células de los mamíferos la actividad de un complejo ciclina E-Cdk2 impulsa la célula hacia la fase S, mientras que la actividad del complejo ciclina B1-Cdk1 la conduce a la mitosis. Las Cdk no siempre estimulan actividades, también inhiben fenómenos inapropiados. Por ejemplo, la actividad del complejo ciclina B1-Cdk1 durante G_2 impide que la célula replique de nuevo el DNA que ya se replicó antes en el ciclo celular (pág. 557). Esto ayuda a asegurar que cada región del genoma se replique una vez y sólo una vez en cada ciclo.

Los estudios enfocados en la identificación de las funciones de las diversas ciclinas y Cdk en las células de los mamíferos utilizan ratones con eliminación génica que carecen de un gen funcional para una proteína particular. Los fenotipos de estos ratones dependen del gen que se eliminó. Por ejemplo, los ratones que son incapaces de sintetizar Cdk1 o ciclina B1 no sobreviven, lo que indica que estos genes son esenciales para un ciclo celular normal. En cambio, los ratones que carecen de un gen que codifica una de otras Cdk o subunidades de ciclina se desarrollan sorprendentemente bien, lo que sugiere que otros miembros de la familia génica pueden asumir las funciones de los que faltan. Aun con esta "redundancia génica implícita", la ausencia de cualquiera de estas proteínas reguladoras del ciclo celular produce distintas anormalidades. Por ejemplo, los ratones que carecen de un gen para la ciclina D1 son más pequeños que los animales control, lo que se debe a una reducción en la intensidad de la división celular en todo el cuerpo. Además, los animales con deficiencia de ciclina D1 presentan una falta particular de proliferación celular durante el desarrollo de la retina. Aunque parece que los ratones que carecen de Cdk2 se desarrollan de manera normal, tienen defectos específicos durante la meiosis, lo que refuerza las importantes diferencias en la regulación de las divisiones mitóticas y meióticas.

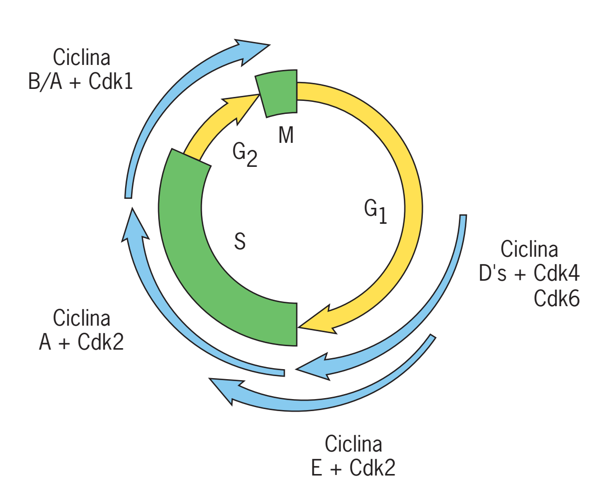


FIGURA 14-8 Combinaciones entre varias ciclinas y proteincinasas dependientes de ciclina en distintas etapas del ciclo celular de los mamíferos. La actividad de Cdk durante la fase G_1 temprana es muy baja, lo que promueve la formación de complejos previos a la replicación en los orígenes de la replicación (véase fig. 13-20). Para la mitad del G_1, la actividad de Cdk es evidente por la relación de Cdk4 y Cdk6 con las ciclinas de tipo D (D1, D2 y D3). Entre los sustratos para estas Cdk se encuentra una proteína reguladora importante llamada pRb (sección 16.3, fig. 16-14). La fosforilación de pRb conduce a la transcripción de varios genes, inclusive los que codifican para las ciclinas E y A, Cdk1 y proteínas participantes en la replicación. La transición de G_1 a S, que comprende el inicio de la replicación, es impulsada por la actividad de la ciclina E-Cdk2 y los complejos ciclina A-Cdk2. La transición de G_2 a M se inicia por la activación de ciclina A-Cdk1 y los complejos ciclina B1-Cdk1, que se cree fosforilan sustratos tan diversos como proteínas citoesqueléticas, histonas y proteínas de la envoltura nuclear. (La cinasa Cdk1 de los mamíferos es equivalente a la proteincinasa cdc2 de las levaduras con fisión; su inhibición y activación son similares a las que se indican en la figura 14-6.) (Tomada de C. J. Sherr, Cell 73:1060, 1993; con autorización de Cell Press.)

Puntos de revisión, inhibidores de cinasa y respuestas celulares La *ataxia-telangiectasia* es un trastorno hereditario recesivo que se caracteriza por una multitud de síntomas diversos, inclusive un riesgo muy alto para ciertos tipos de cáncer.[2] Durante el final del decenio de 1960 (tras la muerte de varios individuos que se sometieron a radioterapia) se descubrió que los pacientes con ataxia-telangiectasia son en extremo sensibles a la radiación ionizante (pág. 565). También lo son las células de estos pacientes, que carecen de una respuesta protectora crucial que se observa en las células normales. Cuando las células normales se someten a tratamientos que dañan el DNA, como radiación ionizante o fármacos que alteran el DNA, su avance en el ciclo celular se detiene mientras el daño se repara. Por ejemplo, si una célula normal recibe radiación durante la fase G_1 del ciclo celular, la progresión a la fase S se retrasa. De igual manera las células radiadas en la fase S posponen la síntesis adicional de DNA, en tanto que las células afectadas durante G_2 retrasan su ingreso a la mitosis.

Los estudios de este tipo realizados en levaduras dieron origen al concepto, formulado por Leland Hartwell y Ted Weinert en 1998, de que las células tienen **puntos de revisión** como parte de su ciclo celular. Los puntos de revisión son mecanismos que detienen el progreso del ciclo celular si cualquier DNA cromosómico se daña o si ciertos procesos críticos no se completaron en forma correcta, como la replicación del DNA durante la fase S o la alineación cromosómica durante la fase M. Los puntos de revisión aseguran que cada uno de los diversos fenómenos que constituyen el ciclo celular, ocurran en forma precisa y en el orden apropiado. Muchas de las proteínas de la maquinaria de los puntos de revisión no tienen ninguna función en los sucesos

[2] Otros síntomas de la enfermedad incluyen: postura inestable (ataxia) resultado de la degeneración de las células nerviosas en el cerebelo, vasos sanguíneos con dilatación permanente (telangiectasias) en la cara y otros sitios, susceptibilidad a la infección y células con una cantidad demasiado elevada de alteraciones cromosómicas. La base de los primeros dos síntomas aún no se ha determinado.

del ciclo celular normal y sólo actúan cuando alguna anormalidad aparece. De hecho los genes que codifican varias proteínas de puntos de revisión se identificaron por primera vez en células mutantes de levaduras que continuaban su avance en el ciclo celular a pesar de sufrir daño en el DNA u otras anormalidades que causaban defectos graves.

Los puntos de revisión se activan durante todo el ciclo celular mediante un sistema de sensores que reconoce el daño del DNA y las anormalidades celulares. Si un sensor detecta la presencia de un defecto, inicia una respuesta que detiene en forma transitoria el progreso del ciclo celular. Entonces la célula puede emplear ese retraso para reparar el daño o corregir el defecto en lugar de continuar a la etapa siguiente. Esto tiene una importancia especial porque las células de los mamíferos que se dividen con daños genéticos corren el riesgo de transformarse en una célula cancerosa. Si el DNA está dañado más de lo que puede repararse, es posible que el mecanismo de revisión transmita una señal que conduce a la muerte de la célula potencialmente peligrosa.

El gen causante de la ataxia-telangiectasia (el gen *ATM*) codifica una proteincinasa que se activa con ciertas lesiones del DNA, sobre todo roturas en la cadena doble (pág. 565). Un hecho notable es que la presencia de una sola rotura en una de las moléculas del DNA de la célula es suficiente para hacer que el ciclo celular se detenga. Otros tipos de lesiones, como las causadas por la replicación incompleta del DNA o la radiación UV, activan una proteincinasa relacionada llamada ATR. Tanto ATM como ATR son parte de complejos multiproteicos capaces de unirse con el DNA dañado. Una vez unidas, ATM y ATR pueden fosforilar una gran variedad de proteínas que participan en los puntos de revisión del ciclo celular y en la reparación del DNA.

¿Cómo es que una célula detiene su progreso de una etapa del ciclo celular a la siguiente? A continuación se presenta un breve examen de dos vías bien estudiadas que están disponibles para que las células de los mamíferos detengan el ciclo celular en respuesta al daño en el DNA.

1. Si una célula que se prepara para la mitosis se somete a radiación UV, la proteincinasa ATR se activa y fosforila y la célula detiene el ciclo celular en G_2. Se piensa que las moléculas de proteincinasa de ATR son reclutadas en sitios de DNA monocatenario cubiertos con proteína, como los que se observan cuando se repara el DNA dañado por UV (fig. 13-26). ATR fosforila y activa una cinasa de punto de revisión denominada Chk1 (paso 1, fig. 14-9), que a su vez fosforila Cdc25 en un residuo serina específico (paso 2), lo que convierte la molécula Cdc25 en un blanco para una proteína adaptadora especial que se une a la fosfatasa en el citoplasma (paso 4). Esta interacción inhibe la actividad de fosfatasa de Cdc25 e impide que se importe de nuevo al núcleo. Como se expone en la página 575, Cdc25 suele tener un cometido clave en la transición G_2/M al eliminar de Cdk1 fosfatasas inhibidoras. Así, la ausencia de Cdc25 del núcleo deja Cdk en un estado inactivo (paso 5) y la célula se detiene en G_2.
2. El daño en el DNA también induce la síntesis de proteínas que inhiben en forma directa el complejo ciclina-Cdk que impulsa el ciclo celular. Por ejemplo, las células expuestas a radiación ionizante en G_1 sintetizan una proteína llamada p21 (masa molecular de 21 kDa) que inhibe la actividad de cinasa de la Cdk de G_1. Esto impide que las células fosforilen sustratos clave y que ingresen en la fase S. ATM participa en este mecanismo de punto de revisión. En esta respuesta, ATM fosforila y activa otra cinasa de punto de revisión llamada Chk2 (paso a, fig. 14-9) que fosforila un factor de transcripción (p53) (paso b), que conduce a la transcripción y traducción del gen *p21* (pasos c y d), con la inhibición subsiguiente de Cdk (paso e). Alrededor de 50% de todos los tumores humanos muestran indicios de mutaciones en el gen que codifica p53, lo que refleja su importancia en el control del crecimiento celular. La función de p53 se expone con detalle en el capítulo 16.

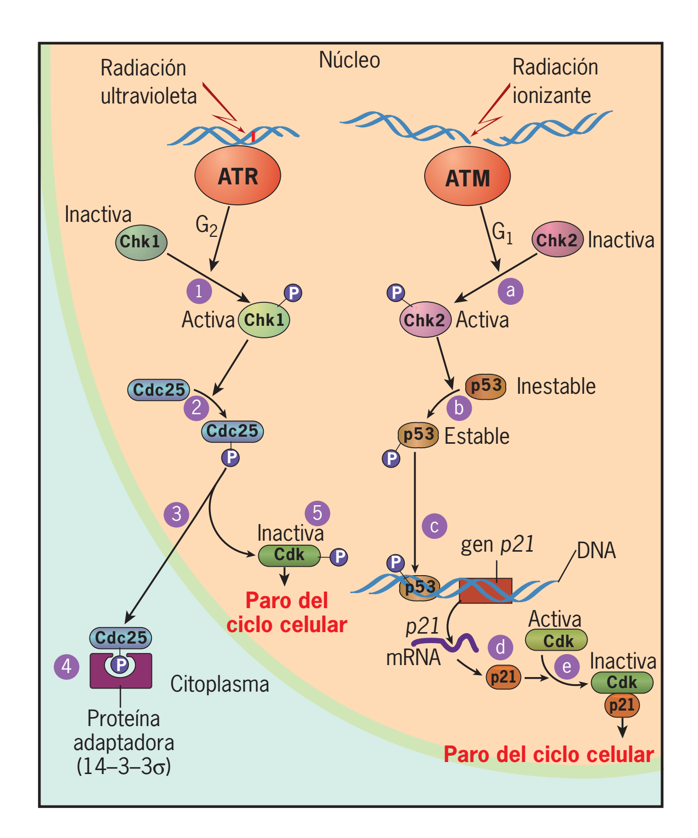
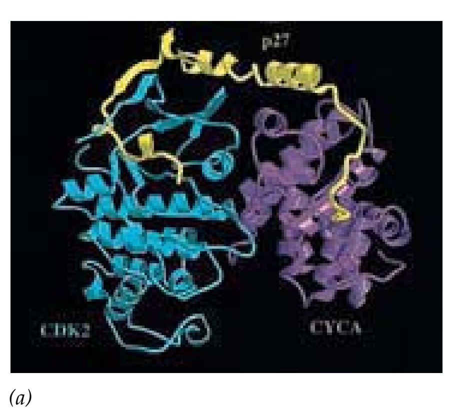


FIGURA 14-9 Modelos para el mecanismo de acción de dos puntos de revisión de daño de DNA. La ATM y la ATR son proteincinasas que se activan con daños específicos del DNA. Cada una de estas proteínas actúa mediante puntos de revisión que señalan las vías que conducen al paro del ciclo celular. En la vía de G_2 que aquí se muestra, ATR fosforila y activa la proteincinasa del punto de revisión Chk1 (paso 1), que fosforila y desactiva la fosfatasa Cdc25 (paso 2), y que en condiciones normales se desplaza entre el núcleo y el citoplasma (paso 3). Una vez fosforilada, Cdc25 se une con una proteína adaptadora en el citoplasma (paso 4) y no puede importarse de nuevo al núcleo, lo que deja a la Cdk en su estado fosforilado inactivo (paso 5). En la vía G_1 mostrada aquí, ATM se fosforila y activa la proteincinasa del punto de revisión Chk2 (paso a), que fosforila p53 (paso b). En condiciones normales p53 tiene una vida muy corta, pero la fosforilación mediante Chk2 estabiliza la proteína, lo que aumenta su capacidad para activar la transcripción de *p21* (paso c). Tras su transcripción y traducción (paso d), p21 inhibe en forma directa la Cdk (paso e). (Se identifican muchas otras vías del punto de revisión de G_1, S y G_2 que incluyen ATM y ATR.)



(a)

(b)

(c)

FIGURA 14-10 p27, un inhibidor de Cdk que detiene la progresión del ciclo celular. *a*) Estructura tridimensional de un complejo entre p27 y ciclina A-Cdk2. La interacción con p27 altera la conformación de la subunidad catalítica Cdk, lo que inhibe su actividad de proteincinasas. *b*) Un par de hermanos de camada a las 12 semanas de edad. Además de poseer distintos genes para el color del pelo, el ratón con pelo oscuro se modificó mediante ingeniería genética de tal manera que carece de ambas copias del gen *p27* (indicado como $p27^{-/-}$), lo que explica su mayor tamaño. *c*) Comparación de los timos de un ratón normal (izquierda) y uno $p27^{-/-}$ (derecha). La glándula del ratón con eliminación de *p27* es mucho más grande por la mayor cantidad de células. (*A*, REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE ALICIA A. RUSSO ET AL., NATURE 382:327, 1995; CORTESÍA DE NIKOLA PAVLETICH. © DERECHOS RESERVADOS 1995 MACMILLAN MAGAZINES LIMITED; *B* Y *C*, TOMADAS DE KEIKO NAKAYAMA ET AL. CORTESÍA DE KEI-ICHI NAKAYAMA, CELL 85:710-711, 1996; CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS.)

La molécula p21 es sólo uno de los por lo menos siete inhibidores conocidos de Cdk. La interacción entre un inhibidor de Cdk diferente (p27) y uno de los complejos ciclina-Cdk se muestra en la figura 14-10*a*. En este modelo la molécula p27 se cuelga sobre ambas subunidades del complejo ciclina A-Cdk2, lo que cambia la conformación de la subunidad catalítica e inhibe la actividad de proteincinasa. En muchas células p27 debe fosforilarse y luego degradarse antes de que pueda avanzarse a la fase S.

Los inhibidores de Cdk, como p21 y p27, también participan en la diferenciación celular. Justo antes que las células comiencen a diferenciarse (ya sea en células musculares, hepáticas, sanguíneas o de algún otro tipo) por lo general se retiran del ciclo celular y dejan de dividirse. Se cree que los inhibidores de Cdk permiten o inducen en forma directa el retiro del ciclo celular. Tal como las funciones de las Cdk y las ciclinas específicas se han estudiado en ratones con eliminación génica, así también tienen sus inhibidores. Los ratones que carecen del gen *p27* tienen un fenotipo distintivo: son más grandes de lo normal (fig. 14-10*b*) y ciertos órganos, como el timo y el bazo, contienen una cantidad mucho mayor de células que los de animales normales (fig. 14-10*c*). En los ratones normales las células de estos órganos particulares sintetizan niveles relativamente altos de p27 y se supone que la ausencia de esta proteína en los animales con deficiencia de p27 permite que las células se dividan varias veces más antes de diferenciarse.

REVISIÓN ?

1. ¿Qué es el ciclo celular? ¿Cuáles son las etapas del ciclo celular? ¿Cómo varía el ciclo celular entre los distintos tipos de células?
2. Describa cómo puede aplicarse el uso de [^{3}H]timidina y la autorradiografía para conocer la duración de los diversos periodos del ciclo celular.
3. ¿Cuál es el efecto de la fusión de una célula en G_1 con una en etapa S?, ¿y de fusionar una célula en fase G_1 con una en M?, ¿y una célula en fase G_2 o S con una en M?
4. ¿Cómo varía la actividad de MPF en todo el ciclo celular? ¿Cómo se relaciona con la concentración de ciclinas? ¿Cómo afecta la actividad del factor promotor de maduración la concentración de ciclina?
5. ¿Cuáles son las funciones respectivas de CAK, Wee1 y Cdc25 en el control de la actividad de Cdk en las células de levadura con fisión? ¿Cuál es el efecto de las mutaciones en los genes *wee1* o *cdc25* en estas células?
6. ¿Qué se conoce como punto de revisión del ciclo celular? ¿Cuál es su importancia? ¿Cómo es que una célula detiene su progresión en alguno de estos puntos de revisión?

14.2 FASE M: MITOSIS Y CITOCINESIS

Mientras que la comprensión de la regulación del ciclo celular depende mucho de los estudios genéticos en levaduras, el conocimiento de la fase M se basa en más de un siglo de investigación microscópica y bioquímica en animales y plantas. Algunos de los primeros hitos en esta investigación se describen en la sección 10.1. El término "mitosis" proviene de la palabra griega *mitos*, que significa "hebra". Lo acuñó en 1882 el biólogo alemán Walther Flemming para describir los cromosomas filiformes que aparecían en forma misteriosa en las células anima-

Profase		
1. El material cromosómico se condensa para formar cromosomas mitóticos compactos. Se observa que los cromosomas se componen de dos cromátides unidas en el centrómero 2. El citoesqueleto se desensambla y el huso mitótico se ensambla 3. El aparato de Golgi y el retículo endoplásmico se fragmentan. La envoltura nuclear se dispersa		
Prometafase		
1. Los microtúbulos cromosómicos se unen con los cinetocoros de los cromosomas 2. Los cromosomas se mueven al ecuador del huso		
Metafase		
1. Los cromosomas están alineados en la placa de la metafase, unidos por microtúbulos cromosómicos a ambos polos		
Anafase		
1. Los centrómeros se dividen y las cromátides se separan 2. Los cromosomas se mueven a los poros opuestos del huso 3. Los poros del huso se separan		
Telofase		
1. Los cromosomas se aglomeran en los polos opuestos del huso 2. Los cromosomas se dispersan 3. La envoltura nuclear se ensambla alrededor de los cúmulos de cromosomas 4. El aparato de Golgi y el retículo endoplásmico se reforman 5. Las células hijas se forman por citocinesis		

FIGURA 14-11 Etapas de la mitosis en una célula animal (dibujos de la izquierda) y una vegetal (micrografías de la derecha). (MICROGRAFÍAS DE ANDREW BAJER.)

les justo antes de dividirse en dos. La belleza y la precisión de la división celular se aprecia mejor si se observa un video acelerado del proceso (p. ej., *www.bio.unc.edu/faculty/salmon/lab/mitosis/mitosismovies.html*), en lugar de leer al respecto en un libro de texto.

La **mitosis** es un proceso de división nuclear en el que las moléculas replicadas de DNA de cada cromosoma se reparten con exactitud en dos núcleos. La mitosis suele acompañarse de la **citocinesis**, un proceso por el que una célula en división se separa en dos, con lo que el citoplasma se divide en dos paquetes celulares. Las dos células hijas resultantes de la mitosis y la citocinesis tienen un contenido genético idéntico entre sí y al de la célula madre de la que provienen. Por tanto la mitosis mantiene el número de cromosomas y genera nuevas células para el crecimiento y el mantenimiento de un organismo. La mitosis puede ocurrir en células haploides o diploides. Las células mitóticas haploides se encuentran en hongos, gametofitos de las plantas y en unos cuantos animales (inclusive abejas macho, conocidas como zánganos). La mitosis es una etapa del ciclo celular en la que la célula dedica toda su energía a una sola actividad: la separación cromosómica. Como resultado la mayoría de las actividades metabólicas de la célula, entre ellas la transcripción y la traducción, se detienen durante la mitosis y la célula entra en una falta relativa de respuesta a los estímulos externos.

En los capítulos previos se vio cuánto puede aprenderse respecto a los factores encargados de un proceso particular mediante el estudio de ese proceso fuera de una célula viva (pág. 280). La comprensión de la bioquímica de la mitosis mejoró mucho con el uso de extractos preparados a partir de huevos de rana. Estos extractos contienen pilas de todos los materiales (histonas, tubulina, etc.) necesarios para sostener la mitosis. Cuando se agregan cromatina o núcleos completos al extracto de huevos, la cromatina se convierte en cromosomas mitóticos, los cuales se dividen en un huso mitótico que se ensambla de manera espontánea dentro de la mezcla libre de células. Muchos experimentos estudian la función de una proteína particular mediante la eliminación de esa proteína del extracto de huevos con la adición de un anticuerpo (agotamiento inmunológico) y la verificación de si el proceso puede continuar en ausencia de esa sustancia (véase la figura 14-21 para obtener un ejemplo).

Por lo general la mitosis se divide en cinco etapas (fig. 14-11): *profase*, *prometafase*, *metafase*, *anafase y telofase*, cada una caracterizada por una serie particular de sucesos. Hay que tener presente que estas etapas representan un segmento de un proceso continuo; la división de la mitosis en fases arbitrarias se hace sólo para facilitar la descripción y la experimentación.

Profase

Durante la primera etapa de la mitosis, la **profase**, los cromosomas duplicados se preparan para la separación y la maquinaria mitótica se ensambla.

Formación del cromosoma mitótico El núcleo de una célula en interfase contiene longitudes enormes de fibras de cromatina. El estado extendido de la cromatina en interfase es ideal para la separación en dos células hijas. Antes de separar sus cromosomas, una célula los convierte en estructuras mucho más cortas y gruesas por un proceso notable de **compactación de cromosomas** (o *condensación cromosómica*), que ocurre en etapas iniciales de la profase (figs. 14-11 y 14-12).

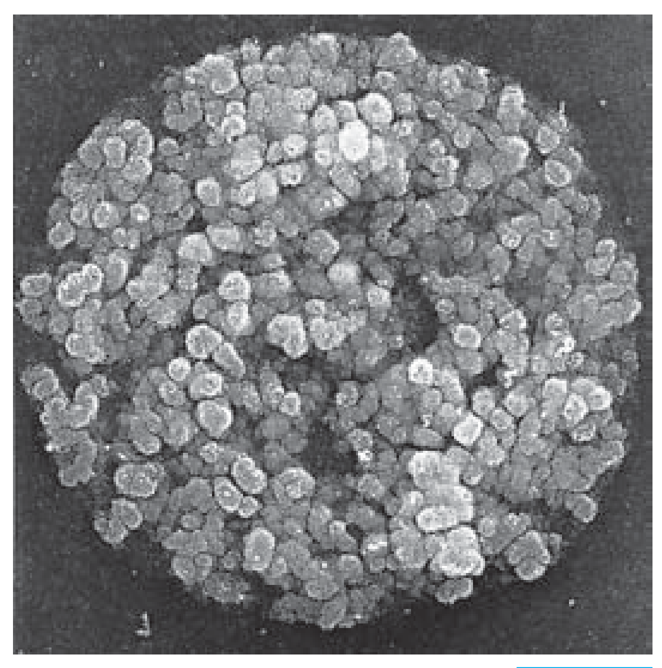
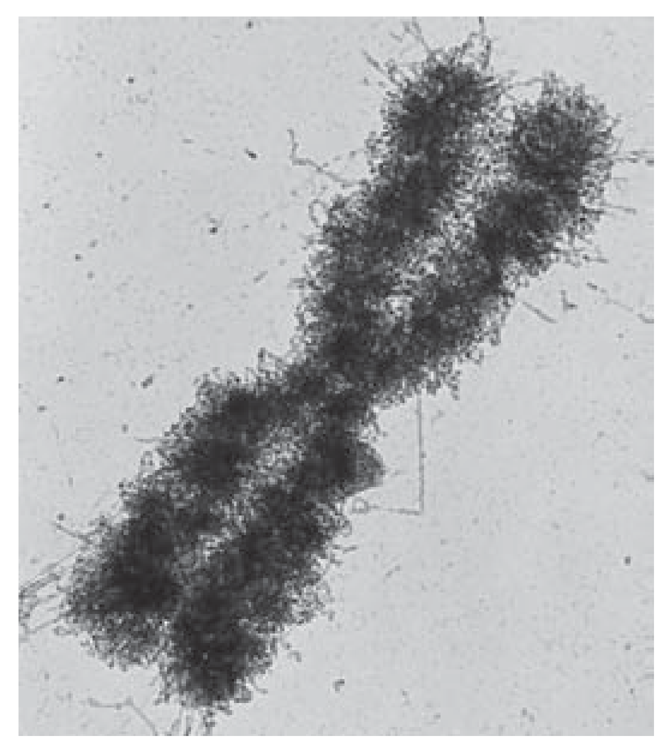


FIGURA 14-12 Los cromosomas de este núcleo en etapa temprana de la profase comenzaron el proceso de compactación que los convierte en cromosomas mitóticos cortos cilíndricos que se separan en una etapa posterior de la mitosis. (TOMADA DE A. T. SUMNER, CHROMOSOMA 100:411, 1991.)

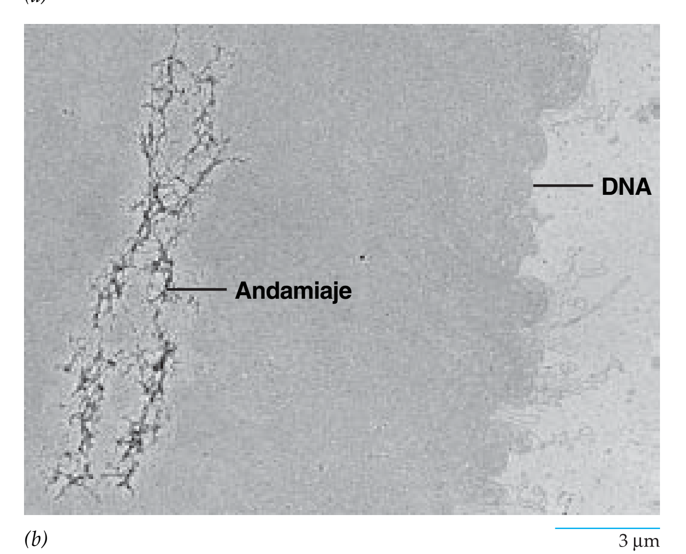
Como se describe en la página 494, la cromatina de una célula en interfase se organiza en fibras de unos 30 nm de diámetro. Los cromosomas mitóticos están compuestos por tipos similares de fibras, como se ve al examinar con el microscopio electrónico los cromosomas completos aislados de las células mitóticas (fig. 14-13*a*). Parece que la compactación cromosómica no altera la naturaleza de la fibra de cromatina, sino la manera en que la fibra de cromatina se empaca. El tratamiento de los cromosomas mitóticos con soluciones que disuelven las histonas y la mayoría de las proteínas no histonas revela una estructura que conserva la forma básica del cromosoma intacto (fig. 14-13*b*).

Las asas de DNA se unen por su base con las proteínas no histonas que conforman el andamiaje cromosómico (que se muestra con mayor aumento en la figura 12-12*a*). Durante la interfase, las proteínas del andamiaje cromosómico se dispersan dentro del núcleo y tal vez forman parte de la matriz nuclear (pág. 508).

En años recientes la investigación de la compactación cromosómica se enfocó en un complejo abundante de múltiples proteínas llamado *condensina*. Las proteínas de la condensina se descubrieron mediante la incubación de núcleos en extractos de huevos de rana y la identificación de las proteínas que se relacionan con los cromosomas durante la compactación. La eliminación de la condensina de los extractos impidió la com-



(a)



(b) 3 µm

FIGURA 14-13 Compactación de cromosoma durante la mitosis. *a*) Micrografía electrónica de una preparación con montura completa de un cromosoma mitótico humano. Se observa que la estructura está compuesta por una fibra nudosa de 30 nm de diámetro, similar a la que se encuentra en los cromosomas de la interfase. *b*) Apariencia de un cromosoma mitótico después de eliminar las histonas y la mayoría de las proteínas no histonas. Las proteínas residuales forman un andamiaje del que puede verse que surgen las hélices de DNA (las hélices de DNA se muestran con más claridad en la figura 12-12*a*). (*A*, por cortesía de Gunther F. Bahr; *B*, tomada de James R. Paulson y Ulrich K. Laemmli, Cell 12:820, 1977; con autorización de Cell Press.)

pactación de los cromosomas. ¿Cómo es que la condensina es capaz de inducir cambios tan drásticos en la arquitectura de la cromatina?

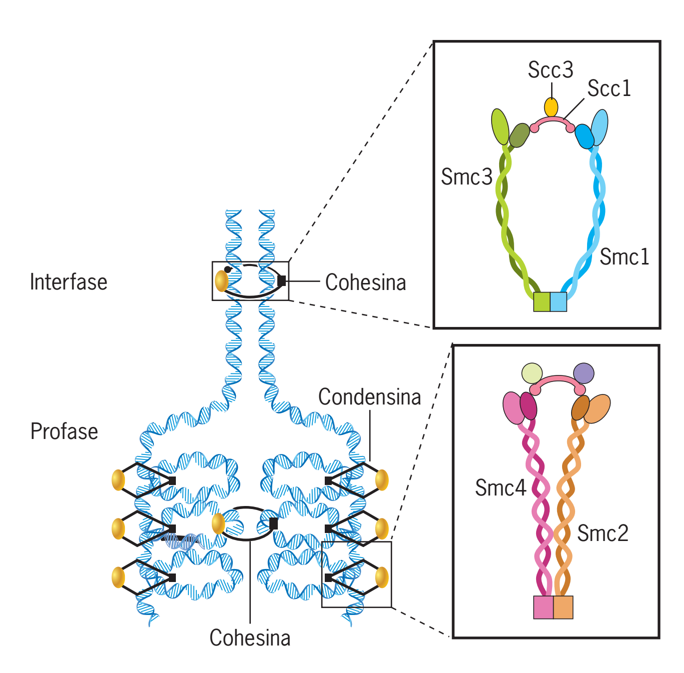


FIGURA 14-14 Modelos de las funciones de condensina y cohesina en la formación de los cromosomas mitóticos. Inmediatamente después de la duplicación, las hélices de DNA de un par de cromátides hermanas se mantendrían juntas por efecto de moléculas de cohesina que rodean las hélices de DNA hermanas, como se muestra en la parte superior del dibujo. Al entrar la célula en mitosis comenzaría el proceso de compactación, con la ayuda de moléculas de condensina, como se muestra en la parte inferior del dibujo. En este modelo, la condensina induce la compactación del cromosoma formando un anillo alrededor de lazos superenrollados de DNA dentro de la cromatina. Las moléculas de cohesina continuarían manteniendo juntas a las cromátides hermanas de DNA. Se propone (pero no se muestra en este dibujo) que ciertas interacciones cooperativas entre moléculas de condensina entonces organizarían los lazos superenrollados en giros más grandes, que se plegarían en una fibra de cromosoma mitótico. Los recuadros superior e inferior muestran la estructura subunitaria de un complejo individual de cohesina y condensina, respectivamente. Ambos complejos se construyen alrededor de un par de subunidades SMC. Las micrografías electrónicas sugieren que cohesina y condensina generan estructuras en forma de anillo y en forma de V, respectivamente. Cada uno de los polipéptidos SMC se repliega en sí mismo para formar un lazo torcido antiparalelo muy alargado con un dominio globular de unión a ATP donde los extremos N y C se reúnen.

El DNA muy enrollado ocupa un volumen mucho menor que el DNA relajado (véase fig. 10-12) y los estudios sugieren que el superplegamiento del DNA tiene participación clave en la compactación de una fibra de cromatina en el diminuto volumen que un cromosoma mitótico ocupa. En presencia de una topoisomerasa y ATP, la condensina es capaz de unirse con el DNA in vitro y enrollar el DNA en rizos superplegados en sentido positivo. Este descubrimiento concuerda bien con la observación de que la compactación de cromosomas en la profase in vivo requiere topoisomerasa II, que junto con la condensina está presente como parte del andamiaje mitótico del cromosoma (fig. 14-13*b*). En la figura 14-14 se muestra un modelo especulativo de la acción de la condensina. Ésta es activada al inicio de la mitosis mediante la fosforilación de varias de sus subunidades por la ciclina-Cdk que se encarga de impulsar las células de

G_2 a la mitosis. Por tanto, se supone que la condensina es uno de los blancos a través de los cuales las Cdk pueden iniciar las actividades del ciclo celular. La estructura subunitaria de una molécula de condensina en forma de V se muestra en el recuadro inferior de la figura 14-14.

Como resultado de la compactación, los cromosomas de una célula mitótica se ven como estructuras cilíndricas distintivas. El examen cuidadoso de los cromosomas mitóticos revela que cada uno de ellos se compone de dos **cromátides** "hermanas", imagen en espejo una de la otra (fig. 14-13*a*). Éstas son producto de la replicación en la interfase previa.

Antes de la replicación el DNA de cada cromosoma en interfase se relaciona en toda su longitud con un complejo de proteínas múltiples llamado **cohesina**. Después de la replicación la cohesina funciona como un puente físico (fig. 14-14) que sostiene las dos cromátides hermanas juntas durante G_2 y hacia la mitosis, en la que al final se separan. Como se indica en la figura 14-14, la condensina y la cohesina tienen una organización estructural similar. Las investigaciones al microscopio electrónico sugieren que la cohesina adopta una configuración circular con un pestillo en un extremo que puede abrirse y cerrarse en respuesta a la unión a ATP y la hidrólisis de éste. Experimentos recientes apoyan la hipótesis de que el anillo de cohesina rodea dos moléculas de DNA hermanas como se muestra en las partes superior e inferior de la figura 14-14.

En los vertebrados la cohesina se libera de los cromosomas en dos etapas distintas. La mayor parte de la cohesina se separa de los brazos de los cromosomas conforme se compactan durante la profase. La disociación es inducida por la fosforilación de subunidades de cohesina a cargo de dos importantes enzimas mitóticas llamadas cinasa tipo Polo y cinasa Aurora B. En la estela de este fenómeno, las cromátides de cada cromosoma mitótico se mantienen relativamente holgadas a lo largo de sus brazos extendidos, pero mucho más apretadas en sus centrómeros (figs. 14-13*a* y 14-15). Se piensa que la cohesina permanece en los centrómeros debido a la presencia ahí de una fosfatasa que elimina cualquier grupo fosfato agregado a la proteína por las cinasas. La liberación de la cohesina desde los centrómeros normalmente se retrasa hasta la anafase, como se describe en la página 590. Si la fosfatasa se desactiva experimentalmente, las cromátides hermanas se separan entre sí de manera prematura antes de la anafase.

Centrómeros y cinetocoros La marca distintiva más notable de un cromosoma mitótico es una indentación o *constricción primaria*, que marca la posición del centrómero (fig. 14-13*a*). El centrómero es la residencia de secuencias de DNA muy repetidas (véase fig. 10-19) que sirven como sitios de unión para proteínas específicas. El examen de los cortes a través de un cromosoma mitótico revela la presencia de una estructura proteinácea similar a un botón, el **cinetocoro**, en la superficie externa del centrómero de cada cromátide (fig. 14-16*a*, *b*). El cinetocoro se ensambla en el centrómero durante la profase. Como se evidencia un poco más adelante, el cinetocoro funciona como: 1) sitio

(*a*) 1 μm

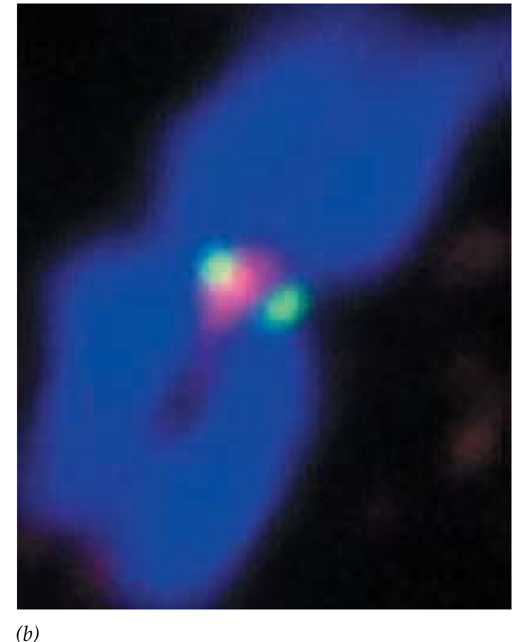

(*b*)

FIGURA 14-15 Cada cromosoma mitótico comprende un par de cromátides hermanas conectadas entre sí por el complejo proteico cohesina. *a*) Micrografía electrónica de barrido de varios cromosomas humanos en metafase, que muestra las cromátides idénticas emparejadas y vinculadas de manera laxa a lo largo y unidas con firmeza por el centrómero. Las cromátides no se separan hasta la anafase. *b*) Micrografía con fluorescencia de un cromosoma en metafase en una célula humana cultivada. El DNA se tiñó de azul, los cinetocoros son verdes y la cohesina es roja. En esta etapa de la mitosis la cohesina ya desapareció de los brazos de las cromátides hermanas, pero permanece concentrada en los centrómeros, donde ambas se mantienen unidas. (*A*, TOMADA DE A. T. SUMNER, CHROMOSOMA 100:415, 1991; *B*, TOMADA DE S. HAUF Y JAN-MICHAEL PETERS, REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE T. J. MITCHISON Y E. D. SALMON, NATURE CELL BIOL 3:E17, 2001; © DERECHOS RESERVADOS 2001, MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)

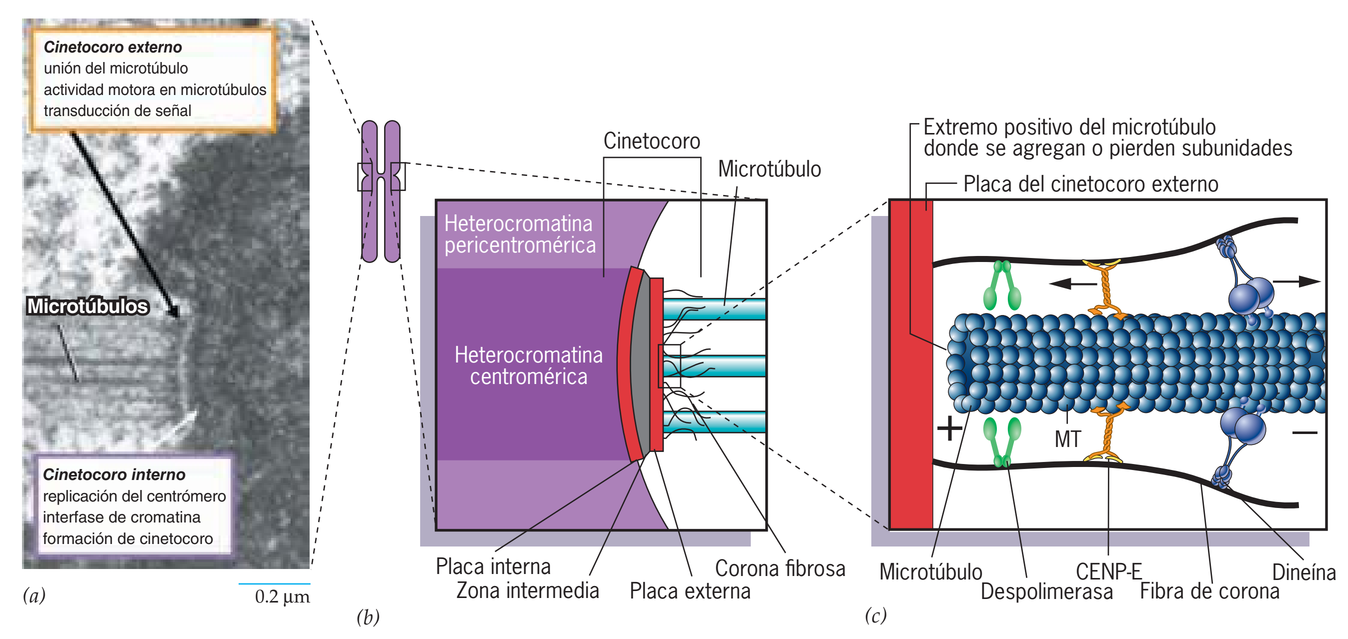


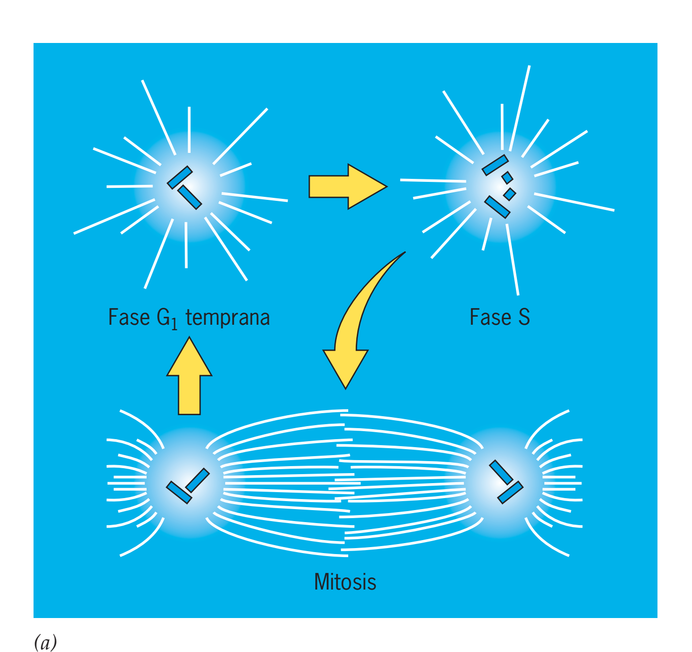
FIGURA 14-16 El cinetocoro. *a*) Micrografía electrónica de un corte a través de uno de los cinetocoros de un cromosoma en metafase de mamífero, que muestra su estructura de tres capas (trilaminar). Puede verse que los microtúbulos del huso mitótico terminan en el cinetocoro. *b*) Representación esquemática del cinetocoro que contiene una placa interna y otra externa electrodensas separadas por una zona intermedia con tinción clara. En la parte (*a*) se indican las funciones propuestas de las placas interna y externa. La placa interna contiene varias proteínas unidas con la heterocromatina centromérica del cromosoma. Relacionada con la placa externa se observa una corona fibrosa, que une las proteínas motoras que participan en el movimiento cromosómico. *c*) Modelo esquemático de la disposición de las proteínas motoras en la superficie externa del cinetocoro. La dineína citoplásmica se mueve hacia el extremo menos de un microtúbulo, mientras que CENP-E, que es miembro de la superfamilia de la cinesina, se mueve hacia el extremo más. También es probable que estos motores participen en la fijación del microtúbulo al cinetocoro. La proteína rotulada "despolimerasa" es un miembro de la superfamilia de cinesinas que interviene en la despolimerización de microtúbulos más que en la motilidad. En este dibujo, las despolimerasas se encuentran en estado inactivo (el microtúbulo no está despolarizándose). (*A*, CORTESÍA DE KEVIN SULLIVAN, TOMADA DE DON W. CLEVELAND, ET AL., CELL 112:408, 2003; CON AUTORIZACIÓN DE CELL PRESS.)

de unión del cromosoma a los microtúbulos dinámicos del huso mitótico (como en la figura 14-29*b*), 2) residencia de varias proteínas motoras participantes en la motilidad de los cromosomas (fig. 14-16*c*) y 3) componente clave en la vía de señalización de un punto de revisión mitótico importante (véase fig. 14-30).

Formación del huso mitótico En el capítulo 9 se describió cómo una estructura especial organizadora de microtúbulos, el **centrosoma**, inicia el ensamble de los microtúbulos en las células animales (pág. 342). Conforme la célula pasa por G_2 hacia la mitosis, los microtúbulos del citoesqueleto se desensamblan con rapidez en preparación para su reensamble como componentes de una "máquina" compleja con microtúbulos llamada **huso mitótico**. Se cree que el desensamble rápido del citoesqueleto de la interfase se produce por la desactivación de las proteínas que estabilizan los microtúbulos (p. ej., proteínas relacionadas con microtúbulos, o MAP) y por la activación de proteínas que disminuyen la estabilidad de estos polímeros.

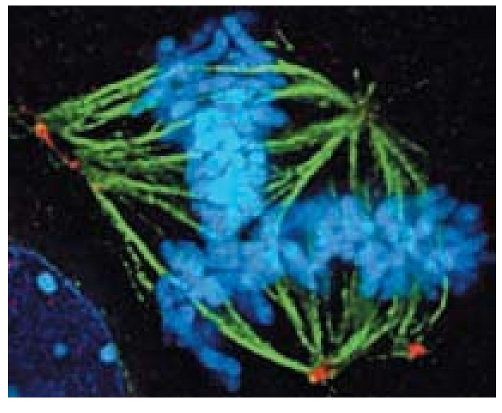
Para comprender la formación del huso mitótico es necesario examinar primero el *ciclo del centrosoma* a medida que avanza en concierto con el ciclo celular (fig. 14-17*a*). Cuando una célula animal sale de la mitosis, el citoplasma contiene un solo centrosoma que posee dos centriolos situados en ángulo recto uno del otro. Cada centriolo del centrosoma inicia su "replicación" en el citoplasma conforme la replicación del DNA comienza en el núcleo al principio de la fase S. El proceso inicia cuando los centriolos se separan dentro del centrosoma. Pronto, un pequeño centriolo *hijo* puede verse cerca de cada centriolo preexistente (paterno) y orientado en ángulo recto de éste (fig. 14-17*b*). La elongación ulterior del microtúbulo convierte el centriolo hijo en un centriolo de tamaño completo. Al principio de la mitosis el centrosoma se separa en dos centrosomas adyacentes, cada uno con un par de centriolos padre e hijo. El inicio de la duplicación del centrosoma en la transición G_1-S se desencadena mediante la fosforilación de una proteína centrosómica por efecto de la ciclina E-Cdk2, el mismo agente que se encarga del inicio de la replicación del DNA (fig. 14-8). Los errores en la duplicación del centrosoma pueden derivar en una división celular anormal y contribuir al desarrollo de cáncer (fig. 14-17*c*).

La primera etapa en la formación del huso mitótico en una célula animal típica es la aparición de microtúbulos dispuestos en una "corona solar", o **astro** (fig. 14-18), alrededor de cada centrosoma durante la profase inicial. Como se explica en el capítulo 9, los microtúbulos crecen por la adición de subunidades en sus extremos más o positivos, mientras que el extremo menos o negativo permanece relacionado con el centrosoma. Después de la formación del astro, los centrosomas se separan uno del otro y se mueven alrededor del núcleo hacia los extremos contrarios de



(a)

(b) 0.3 μm

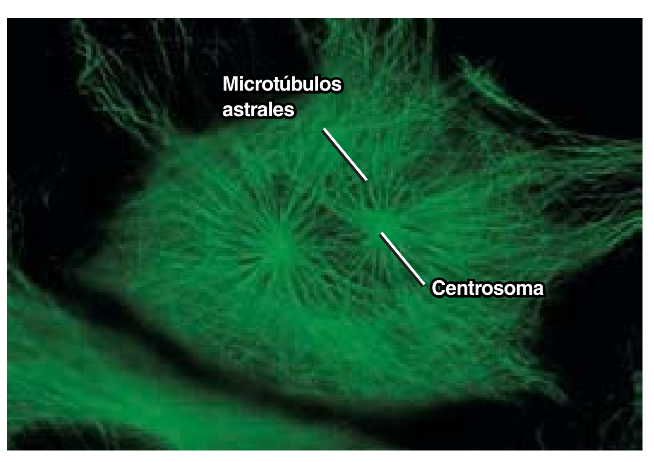


(c)

FIGURA 14-17 El ciclo del centrosoma de una célula animal. *a*) Al final de la mitosis, el centrosoma contiene un solo par de centriolos orientados en ángulos rectos entre sí. Durante la fase S los centriolos hijos se sitúan de modo adyacente a los centriolos maternos, de manera que hay dos pares de centriolos visibles dentro del centrosoma (véase *b*). Los centriolos hijos continúan su elongación durante la fase G_2 y al principio de la mitosis, el centrosoma se divide y cada par de centriolos se convierte en parte de su propio centrosoma. Mientras se separan, los centrosomas organizan las fibras de los microtúbulos que conforman el huso mitótico. *b*) Se ve que el centrosoma de esta célula contiene dos pares de centriolos. Los centriolos más cortos de la célula hija se señalan con flechas. *c*) Esta célula mamaria cancerosa de ratón contiene más del complemento normal de dos centrosomas (rojo) y ensambló un aparato de huso multipolar (verde). Los centrosomas adicionales producen una separación defectuosa de los cromosomas y cantidades anormales de cromosomas (azul), que son característicos de las células malignas. (*A*, tomada de D. R. Kellog, et al., reproducida con autorización de the Annual Review of Biochemistry, vol, 63. © 1994, por Annual Reviews Inc.; *B*, tomada de J. B. Rattner y Stephanie G. Phillips, J Cell Biol 57:363, 1973; mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press; *C*, cortesía de Thea Goepfert y W. R. Brinkley, Baylor College of Medicine, Houston, Tx.)

la célula. La separación de los centrosomas está impulsada por proteínas motoras relacionadas con los microtúbulos adyacentes. Conforme los centrosomas se separan, los microtúbulos que se estiran entre ellos aumentan en cantidad y longitud (fig. 14-18). Al final los dos centrosomas llevan a puntos opuestos uno del otro, lo que establece los dos polos de un huso mitótico *bipolar* (como en la figura 14-17*a*). Después de la mitosis un centrosoma se destina a cada célula hija.

Varios tipos distintos de células animales (inclusive las de embriones jóvenes de ratón) carecen de centrosomas, lo mismo



20 μm

FIGURA 14-18 Formación del huso mitótico. Durante la profase, mientras los cromosomas empiezan a condensarse, los centrosomas se separan entre sí y se organizan en haces de microtúbulos que forman el huso mitótico. Esta micrografía muestra una célula pulmonar de salamandra, cultivada en la profase temprana que se tiñó con anticuerpos fluorescentes contra tubulina, lo que revela la distribución de los microtúbulos celulares (verde). Se observa cómo los microtúbulos del huso mitótico en desarrollo emanan de los ásteres de dos sitios dentro de la célula. Estos sitios corresponden a la localización de los dos centrosomas que se mueven hacia los polos opuestos en esta etapa de la profase. Los centrómeros se sitúan sobre el núcleo celular, que se ve como una región oscura no teñida. (Tomada de Jennifer Waters Shuler, Richard W. Cole y Conly L. Rieder, J Cell Biol 122:364, 1993; mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

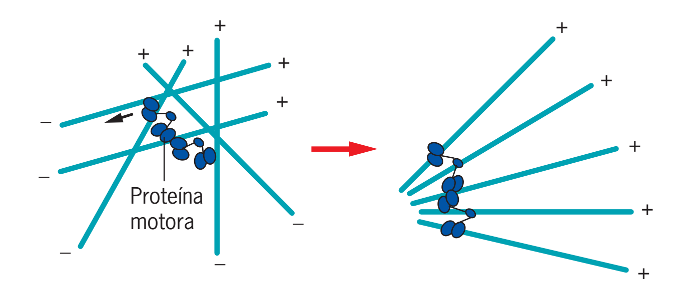


FIGURA 14-19 Formación de un polo del huso en ausencia de centrosomas. En este modelo cada proteína motora tiene múltiples cabezas, las cuales se unen con distintos microtúbulos. El movimiento de estas proteínas motoras dirigidas hacia el extremo menos hace que los extremos menos de los microtúbulos converjan para formar un polo distintivo del huso. Se cree que este tipo de mecanismo facilita la formación de los polos del huso en ausencia de centrosomas. (Tomada de A. A. Hyman y E. Karsenti, Cell 84:406, 1996; con autorización de Cell Press.)

que las células de plantas superiores, aunque todas estas células construyen un huso mitótico bipolar y pasan por una mitosis hasta cierto punto típica. Los husos mitóticos funcionales pueden formarse aun en células mutantes de *Drosophila* que carecen de centrosomas o en células de mamíferos a las que se quitaron los centrosomas por medios experimentales. En todos estos casos, los microtúbulos del huso mitótico se nuclean cerca de los cromosomas y no en los polos, que es donde normalmente se encontrarían los centrosomas. Entonces, una vez que se polimerizan, los extremos negativos de los microtúbulos se unen (se enfocan) en cada polo del huso mediante la actividad de proteínas motoras (fig. 14-19). La fotografía inicial del capítulo que se presenta en la página 570 muestra un huso bipolar que se formó en un extracto de huevos de rana mediante la actividad de las moléculas motoras de microtúbulos. Estas clases de experimentos sugerían que las células poseen dos mecanismos fundamentalmente distintos (uno dependiente y otro independiente del centrosoma) para alcanzar el mismo resultado final. Estudios recientes indican que ambas vías para la formación del huso operan simultáneamente en la misma célula, y que incluso células con centrosomas funcionales nuclean una fracción significativa de sus microtúbulos del huso en los centrosomas.

La disolución de la envoltura nuclear y la partición de los organelos citoplásmicos En la mayoría de las células eucariotas el huso mitótico se ensambla en el citoplasma y los cromosomas se compactan en el nucleoplasma. La rotura de la envoltura nuclear al final de la profase posibilita la interacción entre el huso y los cromosomas. La fosforilación de las moléculas de la lámina por la cinasa mitótica Cdk promueve el desensamble de la lámina nuclear, que constituye la capa interna de la envoltura nuclear. El destino de la porción membranosa de la envoltura nuclear es tema de gran controversia. Según la visión clásica, la envoltura nuclear se fragmenta en una población de pequeñas vesículas que se dispersan por la célula mitótica.

Algunos de los organelos membranosos del citoplasma permanecen más o menos intactos durante la mitosis; éstos incluyen las mitocondrias, los lisosomas y los peroxisomas, así como los cloroplastos de una célula vegetal. En los años recientes se generó un debate considerable respecto al mecanismo por el cual el aparato de Golgi (GC) y el retículo endoplásmico se parten durante la mitosis. De acuerdo con uno de los puntos de vista, el contenido del aparato de Golgi se incorpora al retículo endoplásmico durante la profase y el GC deja de existir por un breve periodo como organelo distintivo. Según una visión alternativa, las membranas de Golgi se fragmentan para formar una población distinta de pequeñas vesículas que se reparten entre las células hijas. Una tercera hipótesis basada sobre todo en estudios con algas y protistas indica que todo el organelo en cuestión se divide en dos y cada célula hija recibe la mitad de la estructura original. Al final es posible que los diferentes tipos de células u organismos utilicen distintos mecanismos de herencia del aparato de Golgi. Las ideas de los autores acerca del destino del retículo endoplásmico también cambiaron. Estudios recientes con células vivas cultivadas de mamíferos sugieren que la red de retículo endoplásmico permanece hasta cierto punto intacta durante la mitosis. Este punto de vista pone en duda los estudios iniciales realizados principalmente con huevos y embriones que sugieren que el retículo endoplásmico se fragmenta durante la profase.

Prometafase

La disolución de la envoltura nuclear marca el inicio de la segunda fase de la mitosis, la **prometafase**, durante la cual el ensamble del huso mitótico se completa y los cromosomas se mueven a su posición en el centro de la célula. Al principio de la prometafase los cromosomas compactados se diseminan por el espacio que era la región nuclear (fig. 14-20). Conforme los microtúbulos del huso penetran a la región central de la célula, los extremos libres (más) de los microtúbulos crecen y se encogen en forma muy dinámica, como si "buscaran" un cromosoma. No existe certeza acerca de si esta búsqueda es del todo aleatoria, ya que las pruebas sugieren que los microtúbulos pueden crecer de modo preferen-

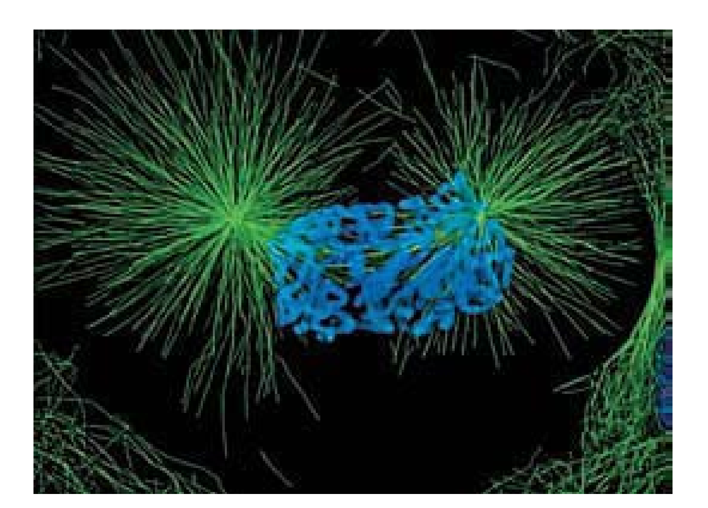


FIGURA 14-20 Prometafase. Micrografía con fluorescencia de una célula pulmonar de salamandra, cultivada en la prometafase temprana de la mitosis, justo después de que la envoltura nuclear se rompiera. Ahora los microtúbulos del huso mitótico pueden interactuar con los cromosomas. El huso mitótico se ve verde después de la marca con un anticuerpo monoclonal contra tubulina, mientras que los cromosomas aparecen azules después de marcarlos con un pigmento fluorescente. (Por cortesía de Alexy Khodjakov.)

cial hacia un sitio que contiene cromatina. Los microtúbulos que hacen contacto con un cinetocoro se "capturan" y estabilizan.

Por lo general un cinetocoro establece contacto inicial con la pared lateral de un microtúbulo y no con su extremo. Una vez que se hace el primer contacto, algunos cromosomas se mueven de modo más activo a lo largo de la pared del microtúbulo, impulsados por las proteínas motoras que se localizan en el cinetocoro. Sin embargo, poco después el cinetocoro tiende a relacionarse de manera estable con el extremo más de uno o más microtúbulos del huso de uno de los polos del huso. Por último, el cinetocoro no unido de la cromátide hija captura sus propios microtúbulos del polo contrario del huso. Como resultado, al final las dos cromátides hermanas de cada cromosoma mitótico se conectan mediante cinetocoros con los microtúbulos que se extienden entre los polos opuestos.

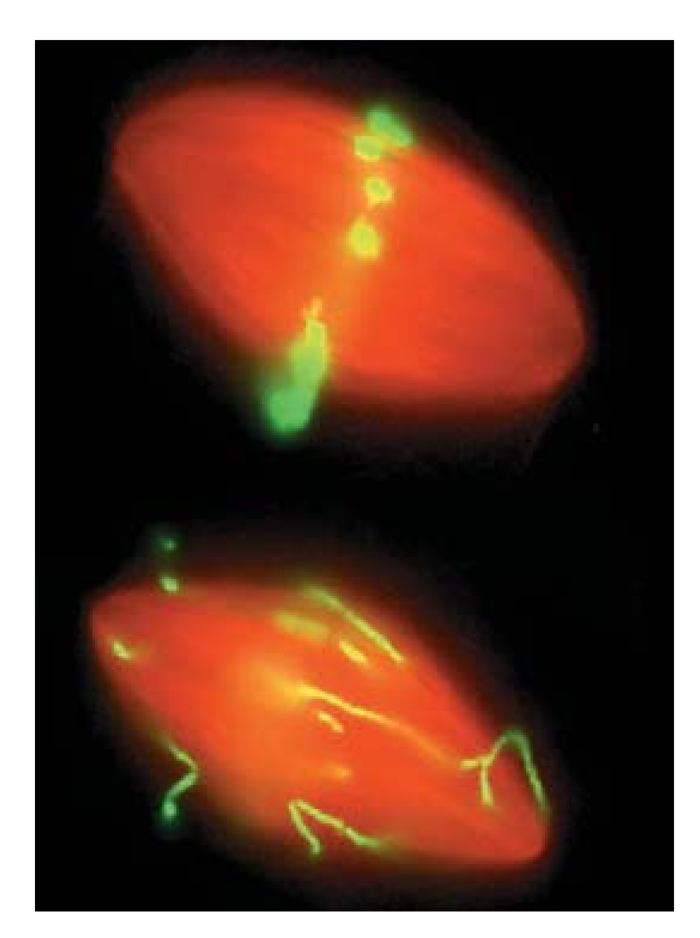


FIGURA 14-21 Consecuencia de una proteína motora faltante en la alineación cromosómica durante la prometafase. La micrografía superior muestra un huso mitótico que se ensambló en un extracto completo de huevos de rana. La micrografía inferior muestra el huso mitótico que se ensambló en un extracto de huevos de rana en la que se eliminó una proteína particular similar a la cinesina llamada Kid, que se encuentra en los brazos de los cromosomas en prometafase. En ausencia de esta proteína motora, los cromosomas no se alinean en el centro del huso, sino que se encuentran estirados sobre los microtúbulos del huso y aglomerados cerca de los polos. En condiciones normales, Kid proporciona la fuerza necesaria para que los cromosomas se alejen de los polos (véase fig. 14-33*a*). (Tomada de Celia Antonio et al., por cortesía de Isabelle Vernos, Cell, vol. 102, portada del número 4, 2000, con autorización de Cell Press.)

Observaciones en células vivas indican que los cromosomas de la prometafase relacionados con los microtúbulos del huso no se mueven en forma directa al centro del huso, sino que oscilan adelante y atrás, hacia el polo y en sentido contrario. Por último, los cromosomas de una célula en prometafase se mueven mediante un proceso llamado **congresión** hacia el centro del huso mitótico, a la mitad entre ambos polos. Las fuerzas necesarias para los movimientos cromosómicos durante la prometafase provienen de proteínas motoras relacionadas tanto con los cinetocoros como con los brazos de los cromosomas (lo que se muestra en la figura 14-33*a* y se explica en el pie de la misma). La figura 14-21 ilustra las consecuencias de una deficiencia de una proteína motora cromosómica cuya actividad aleja los cromosomas de los polos.

Conforme los cromosomas se congregan hacia el centro del huso mitótico, los microtúbulos más largos unidos con un cinetocoro se acortan, en tanto que los microtúbulos más cortos unidos con el cinetocoro hermano se alargan. Se piensa que estos cambios de longitud de los microtúbulos son regidos por diferencias en la fuerza de tracción (tensión) en los dos cinetocoros hermanos. El acortamiento y la elongación de los microtúbulos se deben sobre todo a pérdida o ganancia de subunidades en el extremo más del microtúbulo (fig. 14-22). Un hecho notable es

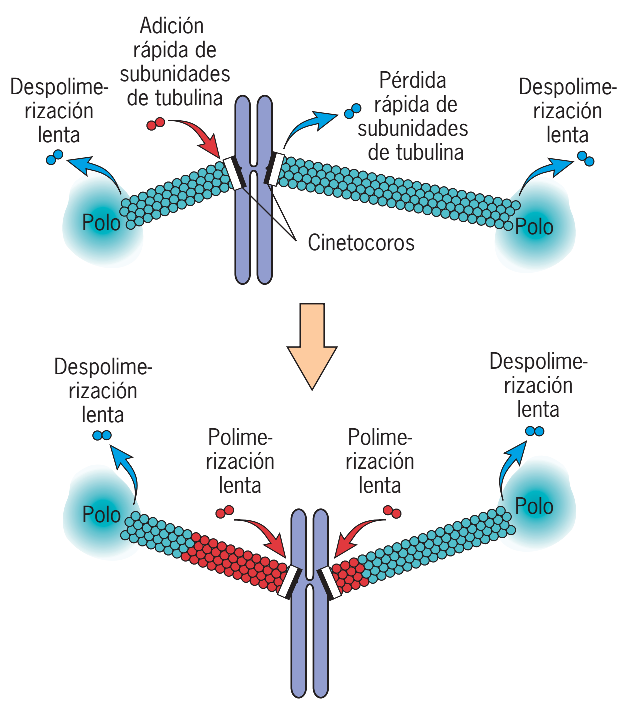


FIGURA 14-22 Comportamiento de los microtúbulos durante la formación de la placa de la metafase. Al principio el cromosoma se conecta con los microtúbulos de los polos opuestos, que pueden tener una longitud muy distinta. Conforme la prometafase continúa, este desequilibrio se corrige como resultado del acortamiento de los microtúbulos de un polo debido a la pérdida rápida de subunidades de tubulina en el cinetocoro y la elongación de los microtúbulos del polo opuesto mediante la rápida adición de subunidades de tubulina en el cinetocoro. Estos cambios se sobreponen a una polimerización y una despolimerización mucho más lentas (dibujo inferior) que ocurren de manera continua durante la prometafase y la metafase, lo que determina que las subunidades del microtúbulo se muevan hacia los polos en un proceso conocido como flujo microtubular.

FIGURA 14-23 El compromiso de un cromosoma durante la prometafase y su movimiento a la placa de la metafase. Esta serie de fotografías tomadas de un video muestra los movimientos de los cromosomas de una célula pulmonar de salamandra en un periodo de 100 s durante la prometafase. Aunque la mayoría de los cromosomas de la célula estaba casi alineada en la placa de la metafase al principio de la secuencia, uno de los cromosomas no se había unido con las fibras del huso (flecha). En B el cromosoma desencaminado se unió al huso y luego se mueve hacia el polo con velocidad variable hasta que llega a su posición estable en F. La posición de un polo se indica con la punta de flecha en A. (Tomada de Stephen P. Alexander y Conly L. Rieder, J Cell Biol 113:807, 1991; mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

que esta actividad dinámica tiene lugar mientras el extremo más de cada microtúbulo permanece unido con un cinetocoro.

De modo eventual, cada cromosoma se coloca en posición sobre un plano en el centro del huso, de manera que los microtúbulos de cada polo tienen una longitud equivalente. La serie de fotografías de la figura 14-23 muestra el movimiento caprichoso de un cromosoma de un sitio periférico hacia el centro del huso mitótico durante la prometafase.

Metafase

La célula llega a la etapa de **metafase** cuando todos los cromosomas se alinean en el ecuador del huso, con una cromátide en cada cromosoma conectada por su cinetocoro con los microtúbulos de un polo y su cromátide hermana conectada por su cinetocoro con los microtúbulos del polo contrario (fig. 14-24). El plano de alineación de los cromosomas en metafase se conoce como *placa de metafase*. El huso mitótico de la célula en metafase contiene un conjunto muy ordenado de microtúbulos que es ideal para la tarea de separar las cromátides duplicadas situadas en el centro de la célula. Desde el punto de vista funcional, los microtúbulos del huso de la metafase de una célula animal pueden dividirse en tres grupos de fibras (fig. 14-24).

1. *Microtúbulos astrales* que irradian hacia afuera desde el centrosoma, para la región exterior del cuerpo del huso. Ayudan a colocar el aparato del huso en la célula y es probable que contribuyan a establecer el plano de citocinesis.
2. *Microtúbulos cromosómicos* (*del cinetocoro*) que van desde el centrosoma hasta los cinetocoros de los cromosomas. En las células de los mamíferos cada cinetocoro está unido con un haz de 20 a 30 microtúbulos, lo que forma una *fibra* del huso. Durante la metafase los microtúbulos cromosómicos ejercen una fuerza de tracción sobre los cinetocoros. Como resultado los cromosomas se mantienen en el plano ecuatorial por "una competencia de tirar la cuerda" entre las fuerzas de tracción equilibradas que ejercen las fibras del huso cromosómico de los polos opuestos. Los microtúbulos cromosómicos son necesarios para el movimiento de los cromosomas hacia los polos durante la anafase.

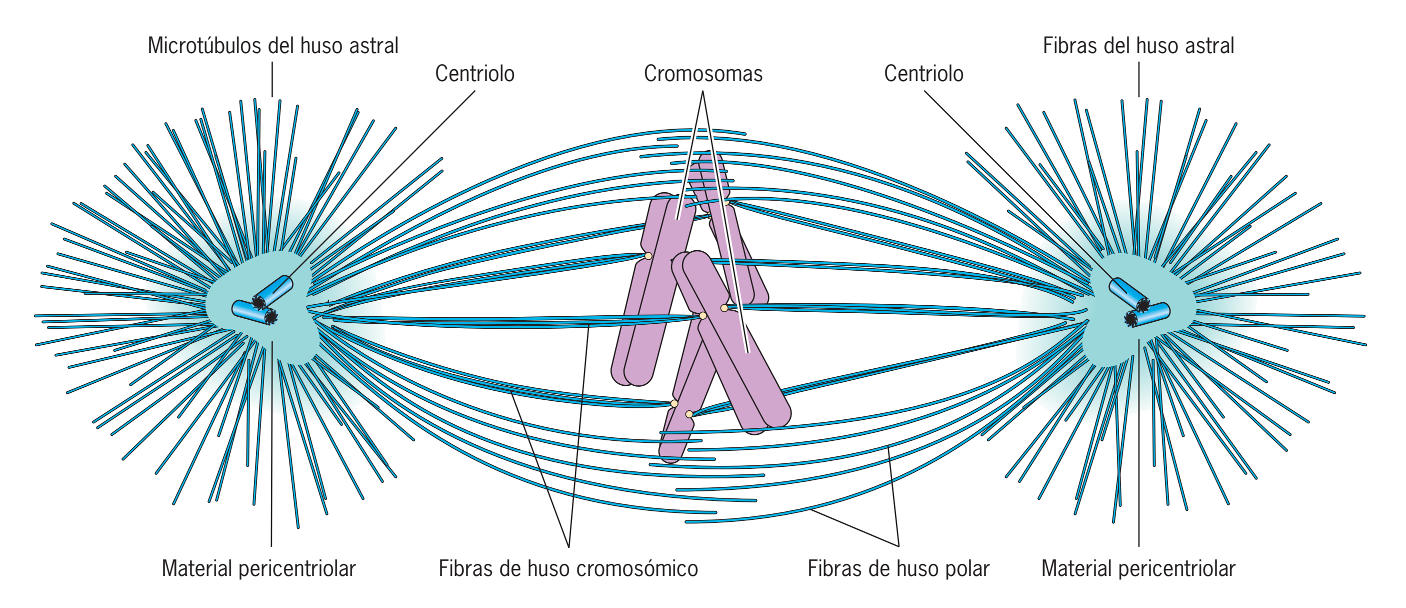


FIGURA 14-24 El huso mitótico de una célula animal. Cada polo del huso contiene un par de centriolos rodeados por material pericentriolar amorfo, en el que se forman los núcleos de los microtúbulos. Pueden verse tres tipos de fibras del huso: astrales, cromosómicas y polares, cuyas funciones se describen en el texto. Todos los microtúbulos del huso, que pueden ser miles, tienen sus extremos menos dirigidos hacia el centrosoma.

3. *Microtúbulos polares* (o *interpolares*) que se extienden desde el centrosoma y más allá de los cromosomas. Los microtúbulos polares de un centrosoma se superponen con sus contrapartes del centrosoma opuesto. Los microtúbulos polares forman una canasta estructural que mantiene la integridad mecánica del huso.

Cuando se ven imágenes o videos de la mitosis, parece que la metafase es una etapa durante la cual la célula hace una breve pausa, como si todas las actividades mitóticas se detuvieran. No obstante, el análisis experimental revela que la metafase es un periodo en el que ocurren sucesos importantes.

Flujo de microtúbulos en el huso de la metafase Aunque no se observe un cambio evidente en la longitud de los microtúbulos cromosómicos cuando se alinean en la placa de la metafase, los estudios en tubulina con marca fluorescente indican que los microtúbulos se encuentran en un estado muy dinámico. Las subunidades se pierden y agregan con rapidez en los extremos positivos de los microtúbulos cromosómicos, aunque se supone que estos extremos están unidos al cinetocoro. Por tanto el cinetocoro no actúa como una tapa al final del microtúbulo que bloquea la entrada o salida de las subunidades terminales, sino que es un sitio de actividad dinámica. Puesto que se agregan más subunidades al extremo más de las que se pierden, existe una adición neta de subunidades en el cinetocoro. Mientras tanto los extremos menos de los microtúbulos experimentan una pérdida neta, por lo que se cree que las subunidades se mueven a lo largo de los microtúbulos cromosómicos del cinetocoro hacia el polo. Este *flujo hacia el polo* de las subunidades de tubulina en un huso mitótico se muestra en el experimento ilustrado en la figura 14-25. Es probable que a la pérdida de subunidades de tubulina en los polos contribuya un miembro de la familia cinesina 13 de proteínas motoras cuya función es promover la despolarización de los microtúbulos más que el movimiento (pág. 339).

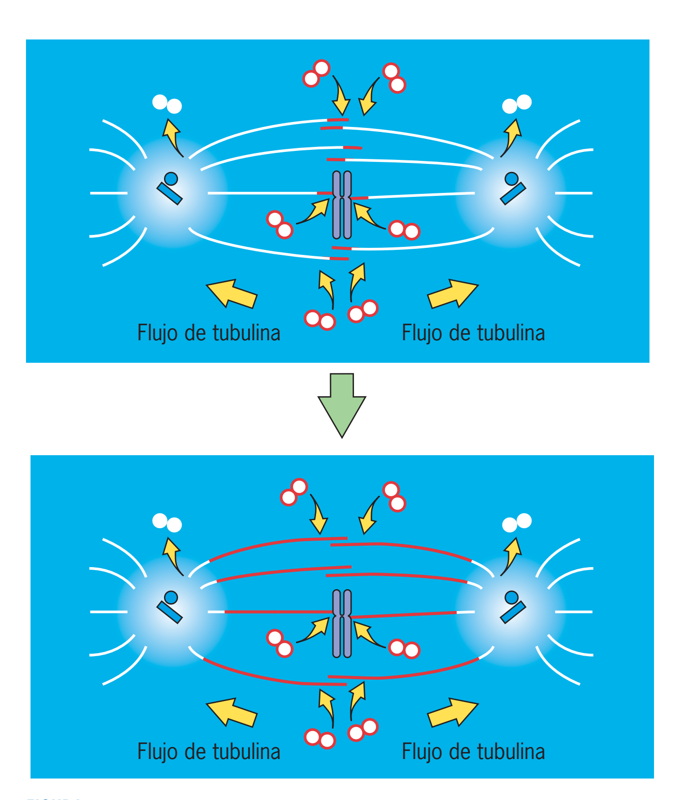


FIGURA 14-25 Flujo de tubulina a través de los microtúbulos del huso mitótico en la metafase. Aunque los microtúbulos parecen estacionarios en esta etapa, la inyección de subunidades de tubulina fluorescente indica que los componentes del huso se encuentran en un estado dinámico de flujo. Las subunidades se incorporan de preferencia en los cinetocoros de los microtúbulos cromosómicos y en los extremos ecuatoriales de los microtúbulos polares, y la pérdida es mayor en los extremos menos de los microtúbulos en la región de los polos. Las subunidades de tubulina se mueven por los microtúbulos de un huso en metafase a una velocidad aproximada de 1 μm por minuto.

Anafase

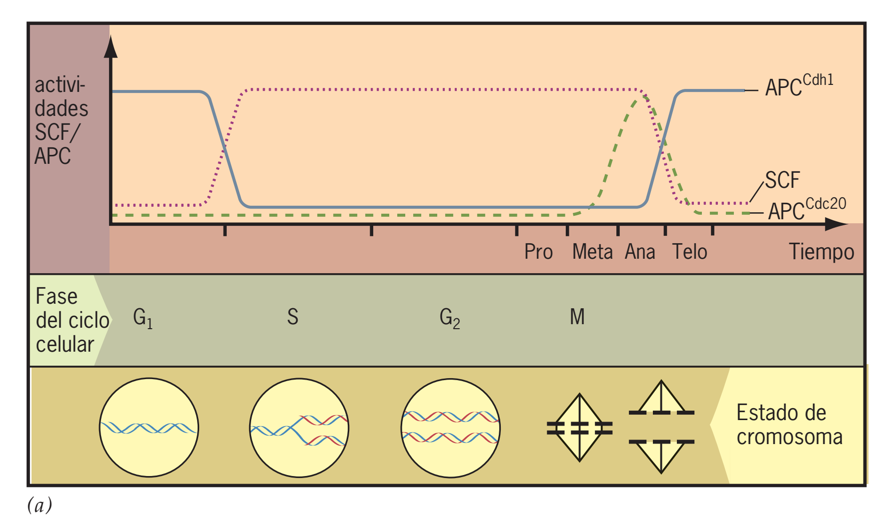
La **anafase** comienza cuando las cromátides hermanas de cada cromosoma se separan e inician su movimiento hacia los polos opuestos.

El control de la anafase Las técnicas genéticas y bioquímicas proporcionan una gran cantidad de información respecto al mecanismo que se encarga del inicio de la anafase. Antes se señaló que dos complejos proteicos distintos, SCF y APC, agregan ubiquitina a las proteínas en diferentes etapas del ciclo celular, lo que las destina a la destrucción por efecto de un proteasoma. La figura 14-26*a* muestra los periodos del ciclo celular durante los que los complejos SCF y APC están activos. Como se ilustra en la figura 14-26*a*, SCF actúa sobre todo durante la interfase. En cambio, el *complejo promotor de la anafase*, o *APC*, desempeña una función clave en la regulación de los eventos que ocurren durante la mitosis. El complejo APC contiene cerca de una docena de subunidades centrales, además de una "proteína adaptadora" que ejerce una función clave para determinar cuáles proteínas sirven como sustrato para APC. Dos versiones alternativas de esta proteína adaptadora (Cdc20 y Cdh1) tienen una función importante en la selección del sustrato durante la mitosis. Los complejos APC que contienen uno u otro de estos adaptadores se conocen como APC^{Cdc20} o APC^{Cdh1} (fig. 14-26*a*).

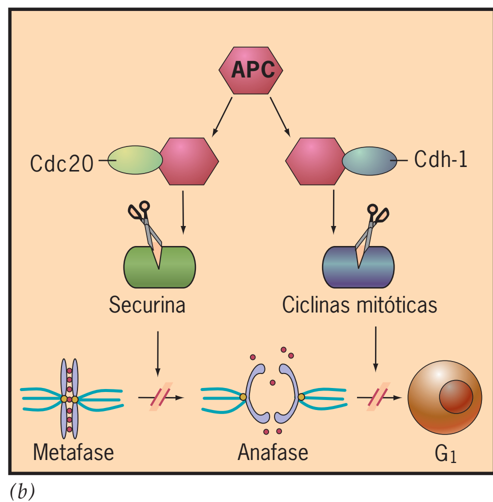
El APC^{Cdc20} se activa durante la transición metafase-anafase (fig. 14-26*a*) y ubiquitina un inhibidor principal de la anafase llamado *securina* (que recibe ese nombre porque asegura la unión entre cromátides hermanas). La ubiquitinación y destrucción de la securina al final de la metafase libera una proteasa activa que se conoce como *separasa*. La separasa retira luego una subunidad clave de las moléculas de cohesina que mantiene unidas las cromátides hermanas (fig. 14-26*b*). La división de la cohesina inicia la separación de éstas para marcar el comienzo de la anafase.

Cerca del final de la mitosis Cdc20 se destruye y el adaptador alternativo, Cdh1, toma el control de la selección del sustrato del APC (fig. 14-26*a*). Cuando Cdh1 se relaciona con el APC, la enzima completa la unión con ubiquitina de las ciclinas mitóticas. La destrucción de estas ciclinas mitóticas conduce a una caída precipitada en la actividad de la Cdk mitótica y la progresión de la célula para que salga de la mitosis y entre a la fase G_1 del siguiente ciclo celular (fig. 14-26*b*). Si la destrucción de las ciclinas se impide, las células permanecen detenidas en la etapa tardía de la mitosis.

Eventos de la anafase Todos los cromosomas de la placa de la metafase se dividen en sincronía al principio de la anafase y las cromátides (ahora denominadas cromosomas porque ya no están unidas a sus hermanas) comienzan su migración hacia el polo (véase fig. 14-11). Cuando el cromosoma se mueve durante la anafase, su centrómero luce como su borde delantero con los brazos del cromosoma atrás (fig. 14-27*a*). El movimiento de los cromosomas hacia el polo contrario es muy lento en relación con otros tipos de movimientos celulares: avanzan cerca de 1 μm

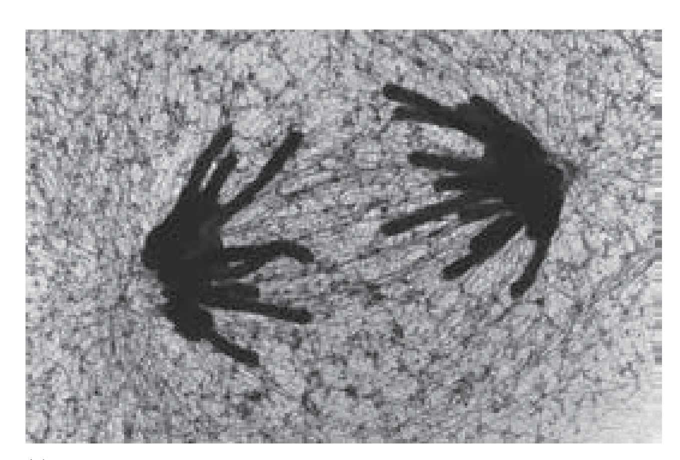


(*a*)

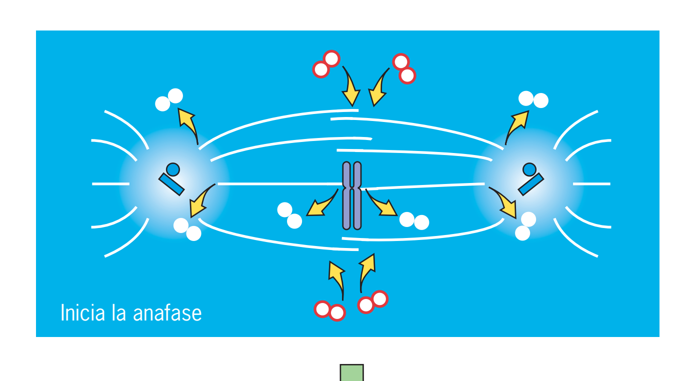


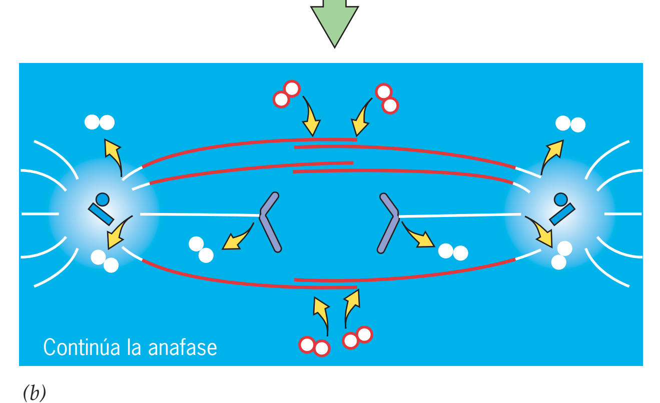
(*b*)

FIGURA 14-26 Actividades de SCF y APC durante el ciclo celular. SCF y APC son subunidades de complejos, que se unen a los sustratos con ubiquitina, lo que conduce a su destrucción por medio de proteasomas. *a*) SCF se encuentra activo sobre todo durante la interfase, mientras que APC (complejo promotor de anafase) se activa durante la mitosis y G_1. Se indican dos versiones diferentes de APC. Los dos APC difieren en su contenido de una proteína adaptadora Cdc20 o Cdh1, lo que modifica el sustrato que el complejo APC reconoce. APC^{Cdc20} tiene actividad en una etapa más temprana de la mitosis que APC^{Cdh1}. (Nota: los mamíferos pueden construir docenas de complejos SCF distintos, que se consideran una sola entidad en esta figura. Las proteínas se convierten en sustratos para complejos SCF después de fosforilarse.) *b*) APC^{Cdc20} es el encargado de destruir proteínas que inhiben la anafase, como la securina. La destrucción de estos sustratos promueve la transición metafase-anafase. APC^{Cdh1} se encarga de unir con ubiquitina proteínas como las ciclinas mitóticas, que inhiben la salida de la mitosis. La destrucción de estos sustratos induce la transición mitosis-G_1. La actividad de APC^{Cdh1} durante el principio de G_1 ayuda a mantener baja la actividad de ciclina-Cdk (fig. 14-8) necesaria para ensamblar complejos de preduplicación en los orígenes de duplicación (fig. 13-20). (*A*, REIMPRESA DE J.-M. PETERS, CURR OPIN CELL BIOL 1998;10:762; DERECHOS RESERVADOS 1998, CON AUTORIZACIÓN DE ELSEVIER SCIENCE.)



(a)





(b)

FIGURA 14-27 El huso mitótico y los cromosomas en la anafase. *a*) Micrografía electrónica de la anafase tardía como ocurre en un extracto libre de células. Se observa que los brazos de los cromosomas quedan detrás, mientras los cinetocoros unidos con las fibras cromosómicas del huso dirigen el camino hacia los polos respectivos. Las fibras cromosómicas del huso en esta parte tardía de la anafase son muy cortas, y ya no se observan entre los bordes de avance de los cromosomas y los polos. Sin embargo, los microtúbulos polares del huso son muy evidentes en la zona intermedia entre los cromosomas que se separan. Se cree que el movimiento relativo de los microtúbulos polares es la causa de la separación de los polos que ocurre durante la anafase B. *b*) Dinámica de los microtúbulos durante la anafase. Las subunidades de tubulina se pierden de ambos extremos de los microtúbulos cromosómicos, lo que produce el acortamiento de las fibras cromosómicas y el movimiento de los cromosomas hacia los polos durante la anafase A. Mientras tanto las subunidades de tubulina se agregan a los extremos más de los microtúbulos polares, que también se deslizan unos sobre otros, lo que produce la separación de los polos durante la anafase B. (*A*, TOMADA DE J. RICHARD MCINTOSH, EN MICROTUBULES, J. HYAMS Y C. L. LLOYD (EDS.). DERECHOS RESERVADOS © 1994. REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE WILEY-LISS, INC., SUBSIDIARIA DE JOHN WILEY & SONS, INC.)

por minuto, un valor calculado por un investigador de la mitosis como el equivalente a un viaje de Carolina del Norte a Italia que tomara cerca de 14 millones de años. La escasa velocidad del movimiento cromosómico asegura que los cromosomas se separen con exactitud y sin enredos. En la sección siguiente se describen las fuerzas que al parecer impulsan el movimiento de los cromosomas durante la anafase.

El movimiento de los cromosomas hacia el polo se acompaña de un acortamiento evidente en los microtúbulos cromosómicos. Desde hace mucho tiempo se apreció que las subunidades de tubulina se pierden del extremo más (con base en el cinetocoro) de los microtúbulos cromosómicos durante la anafase (fig. 14-27*b*). También se pierden subunidades de los extremos menos de estos microtúbulos como resultado del flujo continuo hacia el polo de las subunidades de tubulina que ocurre durante la prometafase y la metafase (figs. 14-22 y 14-25). La principal diferencia en la dinámica de los microtúbulos entre la metafase y la anafase es que las subunidades se agregan al extremo más de los microtúbulos durante la metafase, lo que mantiene constante la longitud de las fibras cromosómicas (fig. 14-25), mientras que se pierden subunidades de los extremos más durante la anafase, lo que produce acortamiento de las fibras cromosómicas (fig. 14-27*b*). Se piensa que este cambio de comportamiento en los extremos más de los microtúbulos es inducido por un cambio en la tensión de los cinetocoros después de la separación de las cromátides hermanas.

El movimiento de los cromosomas hacia los polos se conoce como **anafase A** para distinguirlo de un movimiento distinto, pero simultáneo, la **anafase B**, en la que los dos polos del huso se separan más. La elongación del huso mitótico durante la anafase B se acompaña de la adición neta de subunidades de tubulina a los extremos más de los microtúbulos polares. Por tanto las subunidades pueden agregarse de manera preferente a los microtúbulos polares y retirarse de los microtúbulos cromosómicos al mismo tiempo en distintas regiones del mismo huso mitótico (fig. 14-27*b*).

Fuerzas necesarias para los movimientos cromosómicos en la anafase A principios del decenio de 1960 Shinya Inoué del Laboratorio Biológico Marino de Woods Hole propuso que la despolimerización de los microtúbulos cromosómicos durante la anafase no era una mera consecuencia del movimiento de los cromosomas, sino la causa de éste. Inoué sugirió que la despolimerización de los microtúbulos que comprenden una fibra del huso podría generar suficiente fuerza mecánica para tirar de un cromosoma hacia adelante.

El primer apoyo experimental para el modelo de desensamble provino de estudios en los que los cromosomas unidos con

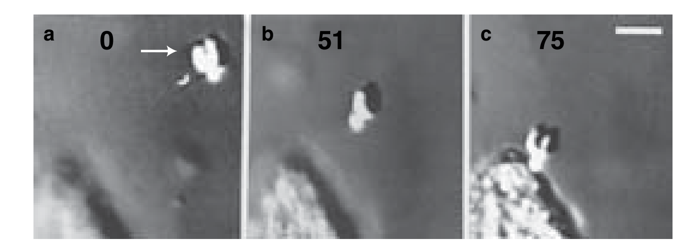


FIGURA 14-28 Demostración experimental de que la despolimerización de los microtúbulos puede mover los cromosomas unidos in vitro. La estructura de la parte inferior izquierda es el remanente de un protozoario destruido. En presencia de tubulina, los cuerpos basales en la superficie del protozoario se usaron como sitios para el inicio de microtúbulos, que crecieron hacia afuera en el medio. Una vez que los microtúbulos se formaron, los cromosomas mitóticos condensados se introdujeron en la cámara y se permitió que se unieran con los extremos de los microtúbulos. La flecha muestra un cromosoma unido al final de un haz de microtúbulos. Después la concentración de tubulina soluble dentro de la cámara se redujo mediante dilución, lo que ocasionó la despolimerización de los microtúbulos. Como lo muestra esta secuencia de video, el abatimiento de los microtúbulos se acompañó del movimiento del cromosoma unido. La barra equivale a 5 μm. (Tomada de Martine Coue, Vivian A. Lombillo y J. Richard McIntosh, J Cell Biol 112:1169, 1991; mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

microtúbulos se mueven como resultado de la despolimerización de los mismos. La figura 14-28*a* muestra un ejemplo de uno de estos experimentos. En este caso el movimiento de un cromosoma unido a un microtúbulo (flecha) ocurre in vitro después de la dilución del medio. La dilución reduce la concentración de tubulina soluble, lo que a su vez promueve la despolimerización de los microtúbulos. Estos tipos de experimentos indican que la despolimerización de los microtúbulos por sí sola es capaz de generar la fuerza suficiente para tirar de los cromosomas por distancias considerables, pero no abordan la interrogante de si la célula utiliza o no este mecanismo.

En la figura 14-29*a* se ilustra un modelo de los procesos que se propone ocurren durante el movimiento cromosómico en la anafase. Como se indica en la figura 14-27*b*, los microtúbulos que constituyen las fibras del huso cromosómico sufren despolimerización tanto en los extremos más como en los menos durante la anafase. Estas actividades combinadas causan el movimiento de los cromosomas hacia el polo. La despolimerización en los extremos menos sirve para transportar los cromosomas hacia los polos debido al flujo en este sentido, que hace pensar en una persona que viaja en una banda sinfín. En cambio, la despolimerización en los extremos más de los microtúbulos sirve para "masticar" la fibra que tira de los cromosomas. Algunas células dependen en mayor medida del flujo hacia los polos, y otras, de la despolimerización de los extremos más. Los estudios con células animales en anafase han revelado que tanto el extremo más como el menos de las fibras cromosómicas son sitios en que se localizan cinesinas despolimerizadoras (miembros de la familia de la cinesina 13, página 339). Estas despolimerasas están indicadas en los extremos opuestos del microtúbulo en la figura 14-29*a*. Si alguna de estas "despolimerasas" de los microtúbulos se inhibe específicamente, la segregación cromosómica durante la anafase se interrumpe al menos en parte. Estas observaciones sugieren que la despolimerización mediada por cinesina dependiente de ATP (en comparación con el tipo de despolimerización que caracteriza a la despolimerización dinámica) constituye la base de la segregación cromosómica durante la mitosis.

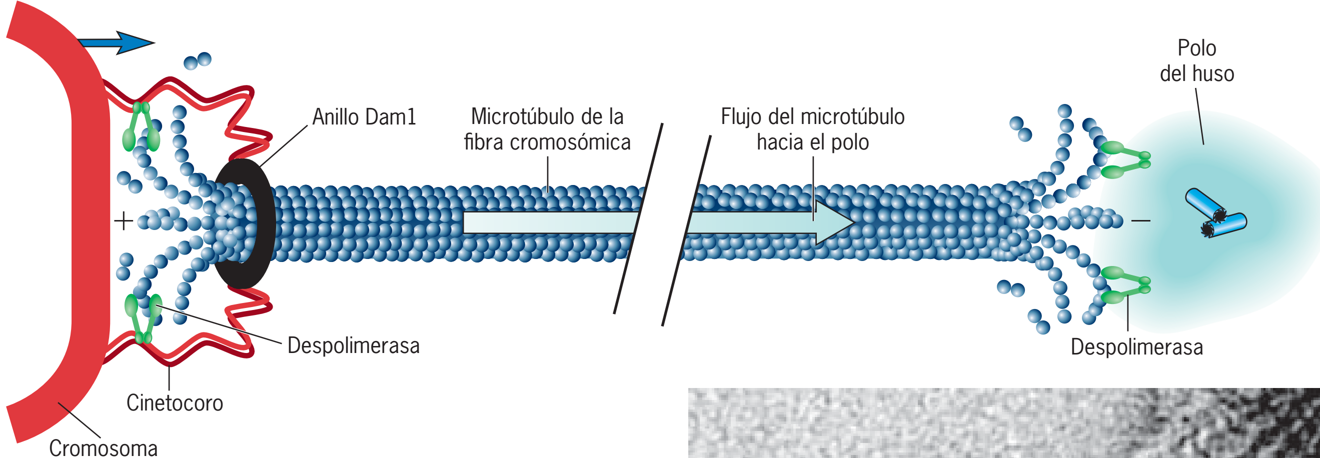
Otros estudios recientes con células de levadura han revelado el mecanismo aparente por el cual los extremos más en despolimerización de estos microtúbulos se unen físicamente a los cinetocoros de los cromosomas. Cada cinetocoro de un cromosoma de levadura contiene un complejo proteínico en forma de anillo llamado Dam1, cuyo diámetro interno de 32 nm es suficientemente grande para rodear sin apreturas un microtúbulo. En presencia de microtúbulos, Dam1 se ensambla para formar anillos y hélices que rodean a aquéllos (fig. 14-29*b*). Si estos microtúbulos rodeados son inducidos a despolimerizarse in vitro, se observa que los anillos se deslizan a lo largo de los microtúbulos por distancias de varios micrómetros, inmediatamente detrás de la punta en despolimerización.

En la figura 14-29*a* también se ilustra la función del anillo Dam1. Según este modelo, la energía liberada por los protofilamentos al desprenderse del microtúbulo (pág. 347) es utilizada para empujar el anillo Dam1 hacia el extremo opuesto del microtúbulo. En virtud de que el anillo se une al cinetocoro del cromosoma en anafase, todo el cromosoma se mueve hacia el polo del huso. Aunque los vertebrados no poseen homólogos cercanos de las proteínas Dam1, es muy probable que en todas las células eucariotas esté presente un complejo proteínico con estructura y función similares. Incluso si no existe tal anillo, motores moleculares presentes en los cinetocoros (fig. 14-16*c*) podrían tener un cometido crítico en el anclaje de los cromosomas a los extremos más de los microtúbulos cromosómicos cuando pierden subunidades.

El punto de revisión del huso

Como se explica en la página 577, las células poseen mecanismos de puntos de revisión que vigilan el estado de los eventos durante el ciclo celular. Uno de estos puntos de revisión opera en la transición entre la metafase y la anafase. El **punto de revisión del huso**, como suele denominarse, se revela mejor cuando un cromosoma no se alinea en forma apropiada en la placa de metafase. Cuando esto sucede el mecanismo del punto de revisión retrasa el inicio de la anafase hasta que el cromosoma mal colocado asuma su posición apropiada en el ecuador del huso. El riesgo de que las células hijas reciban un número anormal de cromosomas (aneuploidía) se eleva mucho si una célula no es capaz de posponer la separación cromosómica. Esta expectativa ha sido confirmada por la identificación de esta falla en algunos niños con deficiencias hereditarias, en una de las proteínas de punto de revisión del huso. Tales individuos presentan un trastorno (llamado MVA) que se caracteriza por un alto porcentaje de células aneuploides y un riesgo muy elevado de sufrir cáncer.

¿Cómo es que la célula determina si uno o más cromosomas no están bien alineados en la placa de metafase? Hay que considerar que un cromosoma sólo está unido a los microtúbulos por uno de los polos del huso, la que quizá sea la circunstancia del cromosoma en posición irregular indicado por la flecha en la figura 14-23*a*. Los cinetocoros no unidos contienen un complejo de proteínas, la mejor estudiada de las cuales es Mad2, que media el punto de revisión del huso. La presencia de estas proteínas en un cinetocoro no unido envía una señal de "*espera*" a



(a)

(b)

FIGURA 14-29 Mecanismo propuesto para el movimiento de los cromosomas durante la anafase. *a*) En el modelo ilustrado aquí, el movimiento de los cromosomas hacia los polos se realiza mediante una combinación de flujo hacia los polos, que mueve el cuerpo de cada microtúbulo hacia uno de los polos, y la despolimerización simultánea del microtúbulo en cada extremo. Las cinesinas despolimerizadoras de la familia de la cinesina 13 se han detectado tanto en el extremo más (cinetocoro) como en el menos (polar) de los microtúbulos cromosómicos, y se postula que son responsables de la despolimerización en sus respectivos sitios. El cromosoma es capaz de permanecer vinculado con el extremo más del microtúbulo cuando se despolimeriza por la presencia del anillo Dam1, que rodea el extremo más del microtúbulo en el cinetocoro. La fuerza requerida para el movimiento del cromosoma es aportada por la liberación de la energía de tensión a medida que el microtúbulo se despolimeriza. La energía que se libera es utilizada por los extremos doblados de los protofilamentos despolimerizantes para deslizar el anillo Dam1 a lo largo del microtúbulo hacia el polo. *b*) Micrografía electrónica de un microtúbulo con tinción negativa rodeado por un anillo proteínico consistente en el complejo Dam1 de levadura, constituido hasta por 10 polipéptidos distintos. El anillo mostrado aquí se ha ensamblado alrededor del microtúbulo durante una incubación in vitro con las subunidades Dam1 purificadas. (*B*, TOMADA DE STEFAN WESTERMANN, ET AL., NATURE 440:434, 2006; CORTESÍA DE GEORJANA BARNES; © COPYRIGHT 2006, MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)

la maquinaria del ciclo celular que impide que la célula continúe hasta la anafase. Una vez que el cromosoma irregular se une a las fibras del huso de ambos polos y se alinea bien en la placa de metafase, el complejo de señalización sale del centrómero, lo que apaga la señal de "espera" y permite que la célula avance hacia la anafase.

La figura 14-30 muestra el huso mitótico de una célula que se detiene antes de la metafase a causa de un solo cromosoma mal alineado. A diferencia de los otros cinetocoros de esta célula, se ve que sólo el cromosoma mal alineado contiene la

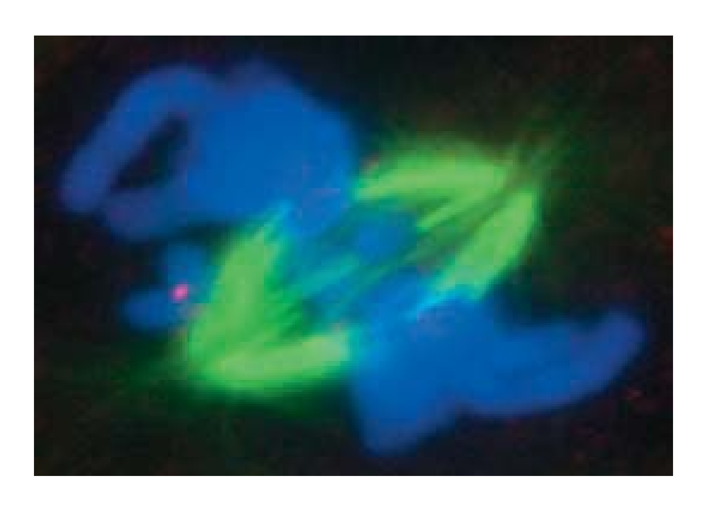


FIGURA 14-30 El punto de revisión del huso. Micrografía con fluorescencia de una célula de mamífero en la prometafase tardía marcada con anticuerpos contra la proteína del punto de revisión del huso Mad2 (rosa) y la tubulina de los microtúbulos (verde). Los cromosomas se ven azules. Se observa que sólo uno de los cromosomas de esta célula contiene Mad2 y este cromosoma aún no se alinea en la placa de la metafase. La presencia de Mad2 en el cinetocoro de este cromosoma es suficiente para prevenir el inicio de la anafase. (TOMADA DE JENNIFER WATERS SHULER, REY-HUEI CHEN, ANDREW W. MURRAY Y E. D. SALMON, J CELL BIOL, VOL 141, PORTADA DEL NÚM. 5, 1998, MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

proteína Mad2. Las moléculas Mad2 pueden inhibir el avance del ciclo celular en tanto la célula contenga cromosomas mal alineados. La inhibición se logra mediante la interacción directa entre Mad2 y el activador de APC Cdc20. Durante el periodo que Cdc20 permanece unido con Mad2, los complejos APC son incapaces de unir con ubiquitina el inhibidor de la anafase securina, lo que mantiene todas las cromátides hermanas unidas una a la otra con el "pegamento" cohesina.

¿Qué sucede con un centrómero no unido que lo convierte en un sitio de unión para las proteínas de punto de revisión como Mad2? Dos propiedades interdependientes distinguen a un cinetocoro no unido: la falta de interacción física con los microtúbulos y la falta de tensión que en condiciones normales ejercen los microtúbulos unidos sobre el centrómero. La falta de interacción con microtúbulos o de tensión parece capaz de detener una célula en metafase. La importancia de la tensión se ilustra en el experimento que se muestra en la figura 14-31 y se describe en el pie de la misma. En ocasiones ambas cromátides del cromosoma se unen con los microtúbulos del mismo polo del huso, lo que deja al cromosoma sin tensión bipolar. Los cinetocoros tienen un mecanismo corrector mediado por una enzima llamada cinasa Aurora B y se cree que responde a la falta de tensión. Conforme a un modelo que está en boga, las moléculas de cinasa Aurora B del cromosoma mal orientado fosforilan un sustrato aún no identificado, lo que desestabiliza la unión del microtúbulo con ambos centrómeros. Una vez liberados de esta unión, los cinetocoros de cada cromátide hermana tienen una nueva oportunidad de unirse con los microtúbulos de los polos opuestos del huso. La inhibición de la cinasa Aurora B en las células o extractos produce mala alineación y separación defectuosa de los cromosomas (véase fig. 18-50).

Telofase

Conforme los cromosomas se aproximan a sus polos respectivos, tienden a reunirse en una masa, lo que marca el principio de la etapa final de la mitosis, o **telofase** (figs. 14-11 y 14-32). En la telofase las células hijas regresan a la condición de interfase: la envoltura nuclear se reforma y los cromosomas se dispersan cada vez más hasta que desaparecen de la vista en el microscopio. La división real del citoplasma en dos células hijas tiene lugar por

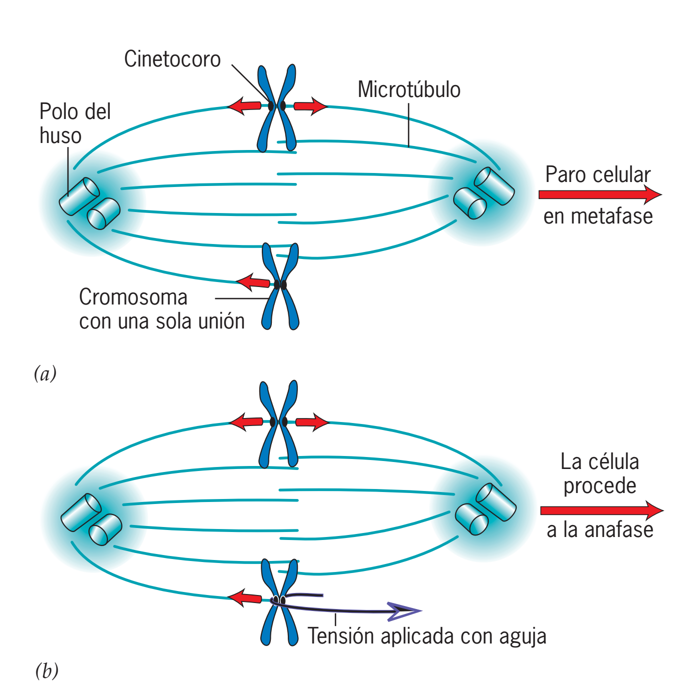


FIGURA 14-31 Demostración experimental de la importancia de la tensión mecánica en el control del punto de revisión de la metafase. *a*) El cromosoma unido en dos puntos de la parte superior del dibujo está sometido a tensión por ambos polos (se indica con las flechas rojas), mientras que el cromosoma que nada más tiene un punto de unión en la parte inferior está sometido a tensión sólo por un polo. Como resultado de este desequilibrio, la célula se detiene en metafase. *b*) Cuando el cromosoma que sólo tenía un punto de unión es tirado hacia el polo no sujeto con una microaguja de vidrio, la tensión artificial aplicada simula la del microsoma unido en dos puntos y la célula procede a la anafase. (El experimento real realizado por X. Li y Bruce Nicklas se efectuó con espermatocitos en meiosis, pero se cree que los resultados se aplican igual a las células mitóticas.)

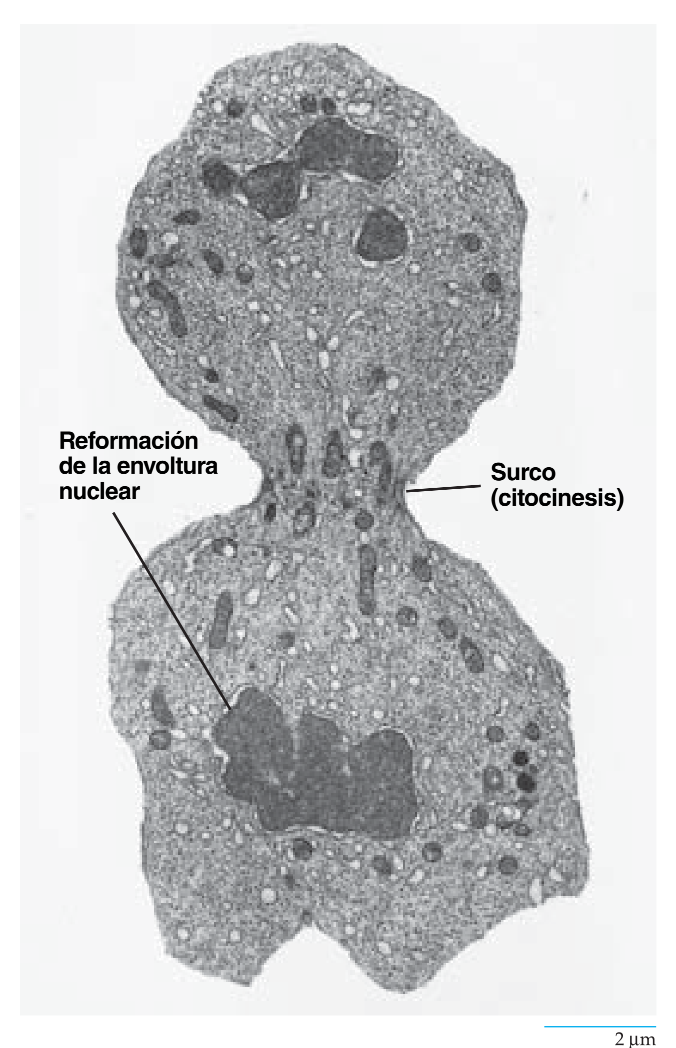


FIGURA 14-32 Telofase. Micrografía electrónica de un corte a través de una célula de la granulosa ovárica en telofase. (Tomada de J. A. Rhodin, Histology, Oxford, 1974.)

un proceso que se describe un poco más adelante. Sin embargo, primero hay que regresar y considerar las fuerzas necesarias para que todos los movimientos principales de los cromosomas ocurran durante la mitosis.

Fuerzas necesarias para los movimientos mitóticos

La mitosis se caracteriza por extensos movimientos de las estructuras celulares. La profase se acompaña de movimiento de los polos del huso a los extremos opuestos de la célula; la prometafase tiene el movimiento de los cromosomas al ecuador del huso; la anafase A de movimiento de los cromosomas desde el ecuador del huso hacia sus polos y la anafase B, de la elongación del huso. En los últimos 10 años se identificaron diversos motores moleculares en lugares diferentes en las células mitóticas de especies muy diversas. Todos los motores que se consideraban vinculados con los movimientos mitóticos son motores de microtúbulos, inclusive varias proteínas distintas relacionadas con la cinesina y la dineína citoplásmica. Algunos de los motores se mueven hacia el extremo más del microtúbulo, otros hacia el extremo menos. Como se expuso antes, una de las cinesinas no se mueve a ninguna parte, sino que promueve la despolimerización de los microtúbulos (pág. 592). Las proteínas motoras se localizan en los polos del huso, junto con las fibras del huso, y dentro de los centrómeros y los brazos de los cromosomas.

En particular tres tipos de estudios proporcionan un vistazo de las funciones de las proteínas motoras específicas: 1) análisis del fenotipo de las células que carecen del motor porque tienen una mutación en un gen que codifica parte de la proteína motora, 2) inyección celular de anticuerpos o inhibidores contra proteínas motoras específicas en varias etapas de la mitosis y 3) agotamiento de la proteína motora en extractos celulares en los que se forman husos mitóticos. Aunque aún no pueden obtenerse conclusiones firmes acerca de las funciones de las proteínas motoras específicas, se sugiere un cuadro general de las funciones de estas moléculas (fig. 14-33):

- Es probable que las proteínas motoras localizadas a lo largo de los microtúbulos polares contribuyan a mantener separados los polos (fig. 14-33*a, b*).
- Es probable que las proteínas motoras que residen en los cromosomas sean importantes para los movimientos de los cromosomas durante la prometafase (fig. 14-33*a*), para mantener los cromosomas en la placa de metafase (fig. 14-33*b*) y para separar los cromosomas durante la anafase (fig. 14-33*c*).
- Es probable que las proteínas motoras situadas a lo largo de los microtúbulos polares superpuestos en la región del ecuador del huso sean las causantes del deslizamiento de unos microtúbulos sobre otros, lo que alarga el huso durante la anafase B (fig. 14-33*c*).

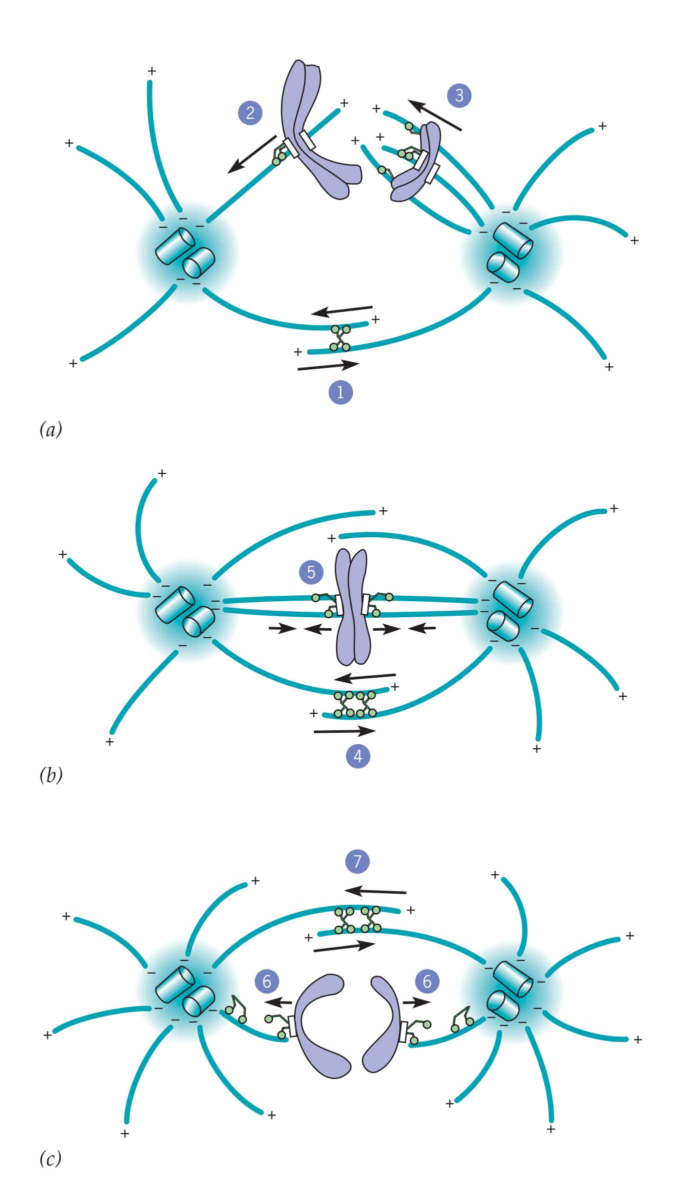


FIGURA 14-33 Actividad propuesta de las proteínas motoras durante la mitosis. *a*) Prometafase. Las dos mitades del huso mitótico se separan una de la otra hacia los polos opuestos, lo que al parecer es el resultado de la acción de los motores dirigidos al extremo más, que causa que los microtúbulos polares de los polos contrarios se deslicen uno sobre otro (paso 1). (Los motores adicionales relacionados con los centrosomas y la corteza no se muestran.) Mientras tanto, los cromosomas se unieron con los microtúbulos cromosómicos y se ven oscilando adelante y atrás sobre los microtúbulos. Al final los cromosomas se mueven al centro del huso, a la mitad entre ambos polos. Los movimientos cromosómicos hacia los polos están mediados por motores dirigidos a los extremos menos (es decir, dineína citoplásmica) que se encuentran en el cinetocoro (paso 2). Los movimientos cromosómicos que se alejan de los polos están mediados por motores dirigidos al extremo más (o sea, proteínas similares a cinesina) que se encuentran en el cinetocoro y sobre todo en los brazos cromosómicos (paso 3) (véase fig. 14-21). *b*) Metafase. Las dos mitades del huso mantienen su separación como resultado de la actividad del motor dirigido al extremo más que se encuentra sobre los microtúbulos polares (paso 4). Se cree que los cromosomas se mantienen en el plano ecuatorial por la actividad equilibrada de las proteínas motoras que están en el cinetocoro (paso 5). *c*) Anafase. Se piensa que el movimiento de los cromosomas hacia los polos requiere la actividad de los motores del cinetocoro (paso 6) que se mueven sobre los microtúbulos cromosómicos o anclan los cromosomas a los microtúbulos mientras se despolimerizan. La separación de los polos (anafase B) parece consecuencia de la actividad continua de los motores dirigidos al extremo más de los microtúbulos polares (paso 7). (TOMADA DE K. E. SAWIN Y J. M. SCHOLEY, TRENDS CELL BIOL 1:122, 1991.)

Citocinesis

Durante la mitosis se realiza la separación de los cromosomas duplicados en los núcleos de las células hijas, pero la célula se divide en dos células hijas por un proceso separado llamado **citocinesis**. El primer indicio de citocinesis en la mayoría de las células animales aparece durante la anafase como una indentación en la superficie celular en una banda angosta alrededor de la célula. Conforme pasa el tiempo, la indentación se profundiza para formar una hendidura que rodea por completo la célula.[3] El plano del surco está en el mismo que antes ocupaban los cromosomas de la placa de metafase, por lo que los dos conjuntos de cromosomas al final se parten entre dos células diferentes (como en la figura 14-32). A medida que una célula se divide en dos, se libera membrana plasmática adicional a la superficie celular mediante vesículas citoplásmicas que se fusionan con el surco divisorio que aumenta. El surco continúa profundizándose al pasar por los remanentes densamente empacados de la porción central del huso mitótico, lo que forma un puente citoplásmico entre las células hijas llamado *cuerpo central* (fig. 14-34*a*). Las superficies opuestas finalmente se fusionan entre sí en el centro de la célula, con lo que ésta se divide en dos (fig. 14-34*b*).

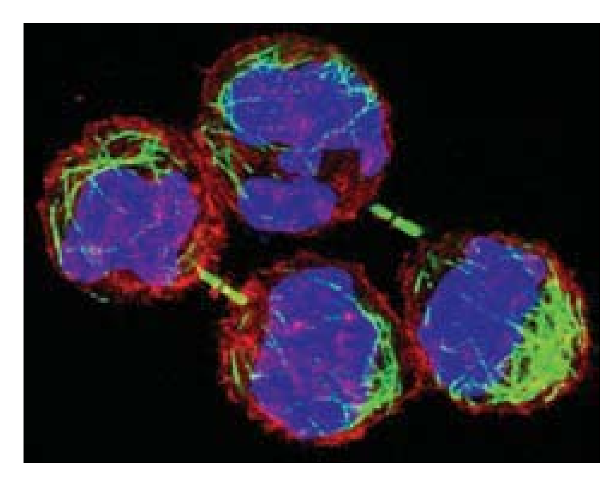
El concepto actual del mecanismo encargado de la citocinesis deriva de una propuesta hecha por Douglas Marsland en el decenio de 1950 y que se conoce como la *teoría del anillo contráctil* (fig. 14-35*a*). Marsland propuso que la fuerza necesaria para dividir la célula se genera en una banda delgada de citoplasma contráctil localizado en la *corteza*, justo debajo de la membrana plasmática del surco. El examen microscópico de la corteza bajo el surco de una célula en división revela la presencia de grandes cantidades de filamentos de actina (figs. 14-35*b* y 14-36*a*).

Entre los filamentos de actina se intercala una menor cantidad de filamentos bipolares cortos de miosina. Estos filamentos se forman de miosina II, como lo evidencia su unión de anticuerpos contra miosina II (fig. 14-36*b*). La importancia de la miosina II en la citocinesis se manifiesta por el hecho de que: 1) los anticuerpos contra miosina producen un cese rápido de la citocinesis cuando se inyectan en una célula en proceso de división (fig. 14-36*c*) y 2) las células que carecen de un gen funcional para miosina II realizan la división celular por mitosis, pero no pueden dividirse de manera normal en las células hijas. El ensamblaje de la maquinaria contráctil de actina y miosina en el plano del futuro surco de escisión es dirigido por una proteína G llamada RhoA. En este estado unido a GTP, la RhoA induce una cascada de sucesos que llevan tanto al ensamblaje de filamentos de actina como al inicio de la actividad motora de la miosina II.

Se cree que el mecanismo generador de la fuerza que opera durante la citocinesis es similar a la contracción basada en la actina-miosina de las células musculares. En tanto el deslizamiento de los filamentos de actina de una célula muscular causa el acortamiento de la fibra muscular, el deslizamiento de los filamentos del anillo contráctil tira de la corteza y la membrana plasmática unida hacia el centro de la célula. Como resultado el anillo contráctil constriñe la región ecuatorial de la célula, de modo muy similar a lo que sucede cuando se tira del cordón para cerrar la abertura de una bolsa.

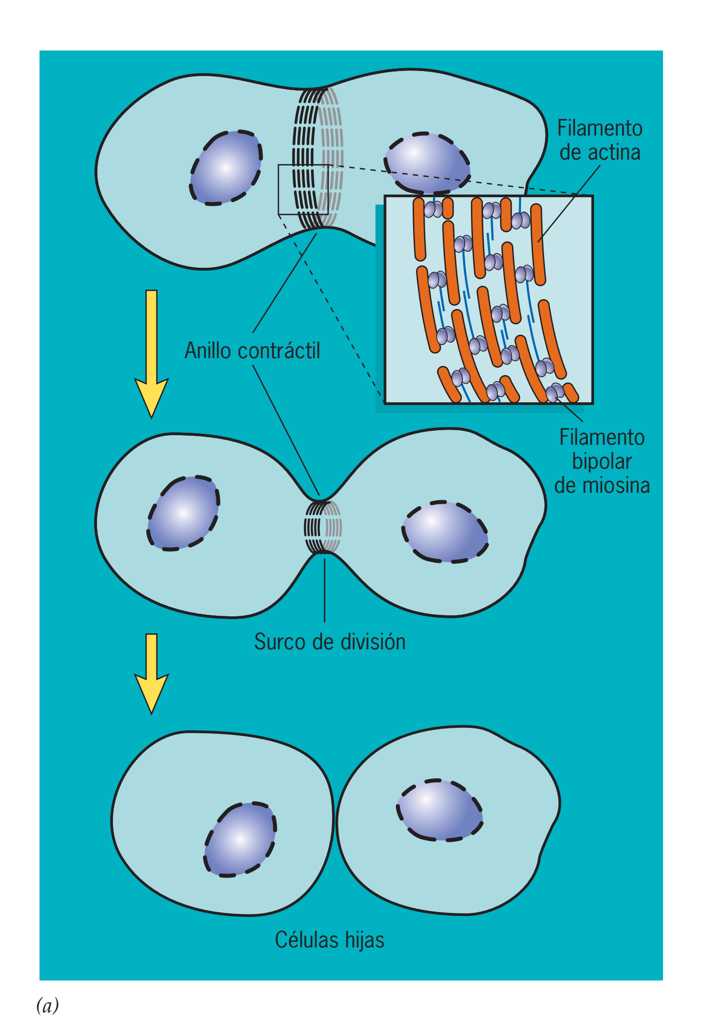
Existe acuerdo general en que la posición del surco divisorio es determinada por el huso mitótico en anafase, pero existe un debate fuerte en torno a la forma en que esto ocurre a nivel molecular. Los estudios pioneros realizados con oocitos de invertebrados marinos por Ray Rappaport del *Union College* en Nueva York demostraron que el anillo contráctil se forma en un

[3] En algunas células, inclusive en el huevo del cinetóforo que se muestra en la figura 4-8*b*, el túnel inicia en un solo lado.

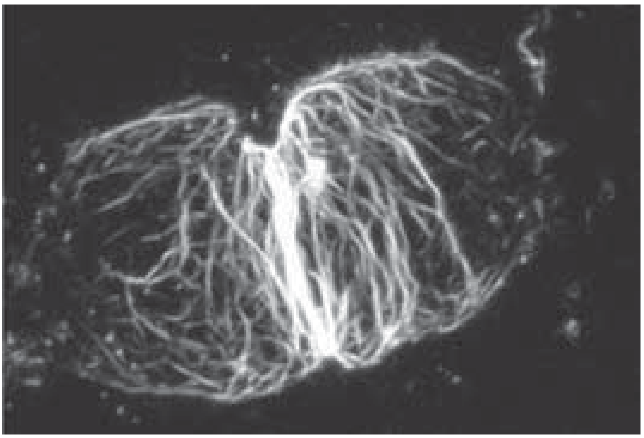


(a) *(b)*

FIGURA 14-34 Citocinesis. *a*) Estas células cultivadas de mamífero se encuentran en la fase final de la citocinesis, llamada abscisión, en la cual el surco de separación corta el cuerpo central; se observa un diminuto puente citoplásmico empacado con remanentes de la porción central del huso mitótico. Los microtúbulos están teñidos de verde, la actina de rojo, y el DNA de azul. *b*) Este óvulo de erizo de mar acaba de dividirse en dos células por citocinesis. (Reimpresa con autorización de Ahna R. Skop et al., Science 305:61, 2004; © copyright 2004; American Association for the Advancement of Science; *b*, cortesía de Tryggve Gustafson.)

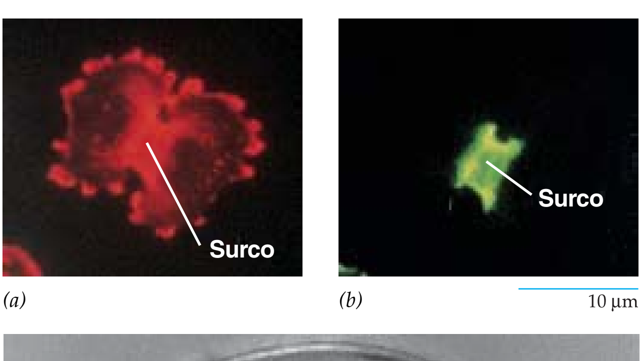


(a)

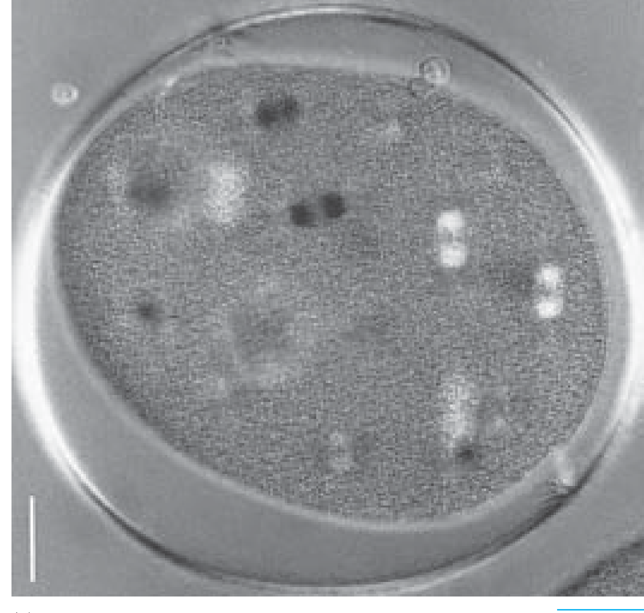


(b)

FIGURA 14-35 Formación y operación del anillo contráctil durante la citocinesis. *a*) Los filamentos de actina ensamblan un anillo en el ecuador celular. La contracción del anillo, que requiere la acción de la miosina, produce la formación de un surco que divide la célula en dos. *B*) Micrografía de fluorescencia confocal de un espermatocito de mosca que experimenta la citocinesis, al final de la primera división meiótica. Se observa que los filamentos de actina, teñidos por la toxina del hongo faloidina, se concentran en una banda ecuatorial circular dentro del surco de separación. (*B*, TOMADA DE DANIEL SAUL ET AL., J. CELL SCIENCE 117:3893, 2004, CORTESÍA DE JULIE A. BRILL, CON AUTORIZACIÓN DE THE COMPANY OF BIOLOGISTS, LTD.)



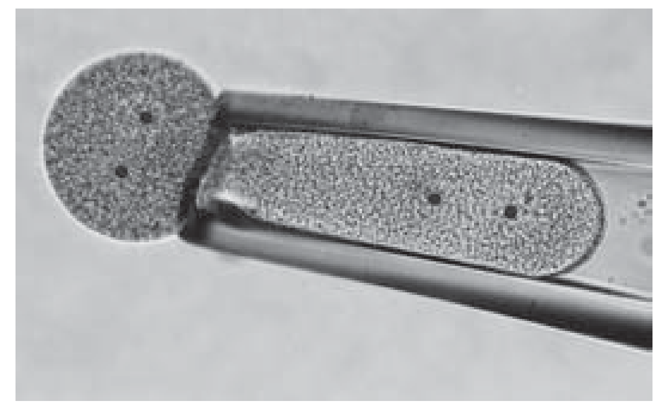
(a) *(b)* 10 μm



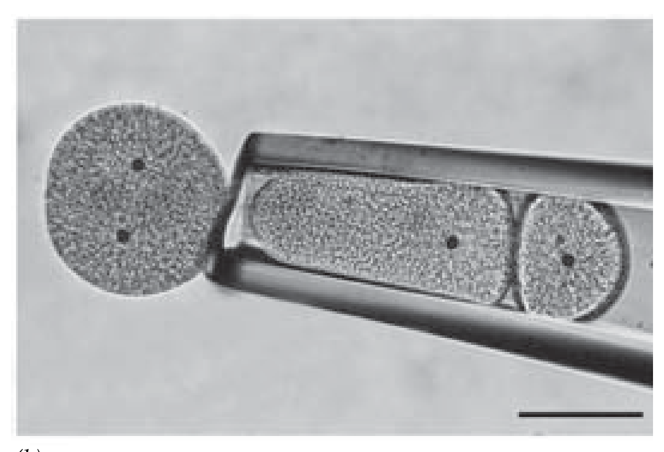
(c) 30 μm

FIGURA 14-36 Demostración experimental de la importancia de la miosina en la citocinesis. *a* y *b*) Localización de la actina y la miosina II en una ameba *Dictyostelium* durante la citocinesis, demostrada por inmunofluorescencia doble. *a*) Los filamentos de actina (rojos) se localizan en el surco de separación y en la periferia celular, donde desempeñan una función clave en el movimiento celular (sección 9.7). *b*) La miosina II (verde) se localiza en el surco de división, parte de un anillo contráctil que rodea al ecuador. *c*) Huevo de estrella de mar al que se aplicó una microinyección de anticuerpo contra miosina de estrella de mar, como se observa con luz polarizada (que hace que los husos mitóticos se vean más brillantes o más oscuros que el fondo por la presencia de microtúbulos orientados). Mientras la citocinesis se suprime por completo con los anticuerpos, la mitosis (como lo revelan los husos mitóticos) continúa intacta. (*A* Y *B*, POR CORTESÍA DE YOSHIO FUKUJI; *C*, TOMADA DE DANIEL P. KIEHART, ISSEI MABUCHI Y SHINYA INOUÉ, J CELL BIOL 94:167, 1982; MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

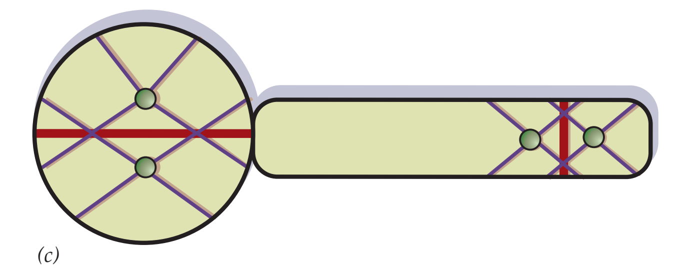
plano a la mitad de la distancia entre los polos del huso, incluso si uno de los polos era desplazado por medio de una microaguja insertada en la célula. En las micrografías de la figura 14-37 se muestra un ejemplo de la relación entre la posición de los polos del huso y el plano de ruptura. Estos estudios sugieren que el sitio de ensamblaje de los filamentos de actina, y por tanto del plano de citocinesis, es determinado por una señal que emana de los polos



(a)



(b)



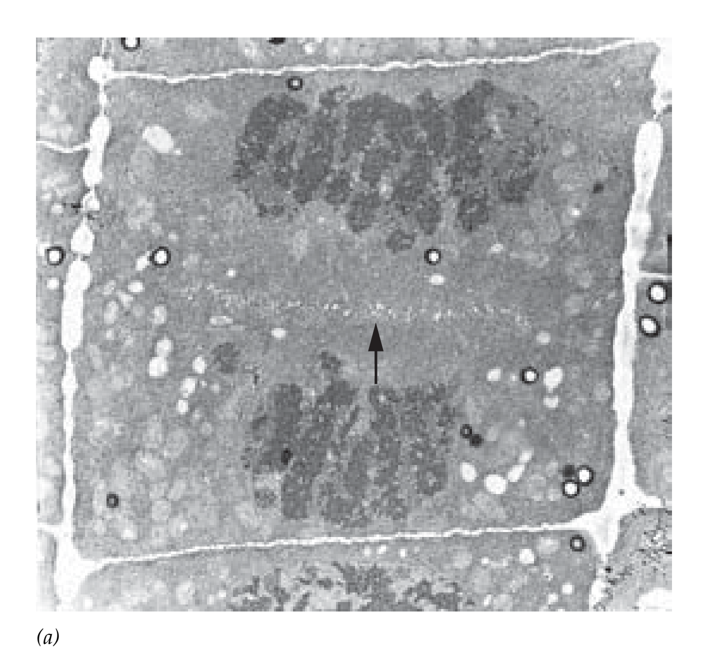
(c)

FIGURA 14-37 El sitio de formación del plano de separación y el momento en el que la división ocurre depende de la posición del huso mitótico. *a*) Se permitió que este huevo de equinodermo se dividiera una vez para formar un embrión de dos células. Luego, cuando el huso mitótico apareció en ambas células, se extrajo una con una micropipeta, lo que ocasionó que adquiriera una forma cilíndrica. Las dos manchas oscuras en las células son los polos del huso que se formaron antes de la segunda división de cada célula. *b*) Nueve minutos más tarde, la célula cilíndrica ya completó la división, mientras que la célula esférica aún no empieza a dividirse. Estas fotografías indican que: 1) el plano de división se forma entre los polos del huso, sin importar su posición, y 2) que la división ocurre con más rapidez en la célula cilíndrica. La barra equivale a 80 μm. *c*) Estos resultados pueden explicarse si se asume: 1) que el plano de división (barra roja) se forma donde se superponen los microtúbulos astrales y 2) que la división ocurre más pronto en la célula cilíndrica porque la distancia entre los polos (esferas verdes) y el sitio de división es menor, lo que acorta el tiempo que tarda la señal de división en llegar a la superficie. (*A* y *B*, tomadas de Charles B. Shuster y David R. Burgess, J Cell Biol 146:987, 1999; mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

del huso. Se piensa que esta señal viaja desde estos polos hasta la corteza celular a lo largo de los microtúbulos astrales. Cuando la distancia entre los polos y la corteza se modifica por medios experimentales, el momento de la citocinesis cambia en grado notable (fig. 14-37). En cambio, los investigadores que realizan estudios con células de mamífero más pequeñas han encontrado indicios de que el sitio de formación del surco es definido por un estímulo que se origina en la parte central del huso mitótico, no en los polos. Los científicos se han esforzado por reconciliar estas observaciones contrastantes, lo cual se refleja en el título de una serie reciente de artículos aparecidos en *Trends in Cell Biology*: "Cytokinesis: the great divide" ("Citocinesis, la gran línea divisoria"). Las explicaciones más sencillas son que 1) diferentes tipos celulares utilizan diferentes mecanismos o 2) ambos mecanismos operan en la misma célula. Estudios recientes dan apoyo a esta última posibilidad.

Citocinesis en las células vegetales: formación de la placa celular Las células vegetales, que están encerradas en una pared celular relativamente rígida, pasan por la citocinesis mediante un mecanismo muy distinto. A diferencia de las células animales que se constriñen por un surco que avanza desde la superficie celular hacia adentro, las células vegetales deben construir una pared celular dentro de una célula viva. La formación de la pared comienza en el centro de la célula y crece hacia afuera para encontrarse con las paredes laterales existentes. La formación de una nueva pared celular inicia con la construcción de un precursor más sencillo que se conoce como **placa celular**.

El plano en el que la placa celular se forma es perpendicular al eje del huso mitótico pero, a diferencia de las células animales, no depende de la posición del huso. Más bien, la orientación del huso mitótico y la placa celular dependen de un cinturón de microtúbulos corticales, la *banda precursora*, que se forma al final de G_2 (véase fig. 9-21). Aunque la banda de la preprofase ya se desarmó para la profase, deja una huella invisible que establece el futuro sitio de división. El primer signo de la formación de la placa celular se observa en la etapa final de la anafase con la aparición del fragmoplasto en el centro de la célula en división. El **fragmoplasto** consiste en cúmulos de microtúbulos que se intercalan con orientación perpendicular a la futura placa (fig. 9-21), junto con vesículas membranosas y material electrodenso. Los microtúbulos del fragmoplasto, que surgen de remanentes del huso mitótico, sirven como pistas para el movimiento de pequeñas vesículas secretoras derivadas del aparato de Golgi en la región. Las vesículas se alinean en un plano entre los núcleos hijos (fig. 14-38*a*). Las micrografías electrónicas de células de tabaco congeladas con rapidez revelaron los pasos por los que las vesículas derivadas de Golgi se reorganizan en la placa celular. Para comenzar el proceso (paso 1, fig. 14-38*b*), las vesículas emiten túbulos digitiformes que tocan y se fusionan con las vesículas vecinas para formar una red tubular entretejida en el centro de la célula (paso 2). Luego más vesículas se dirigen sobre los microtúbulos a los bordes laterales de la red. Las vesículas recién llegadas continúan el proceso de formación de túbulos y fusión, lo que extiende la red hacia afuera (paso 2). Al final el borde líder de la red creciente toca la membrana plasmática y el límite de la célula madre (paso 3). Por último la red tubular pierde sus grietas citoplásmicas y madura hasta convertirse en una división aplanada y continua. Las membranas de la red tubular se convierten en



(a)

+ − Microtúbulo Vesícula

1 2

Membrana plasmática

Pared celular original

3

(b)

FIGURA 14-38 Formación de una placa celular entre dos núcleos hijos vegetales durante la citocinesis. *a*) Micrografía electrónica de bajo aumento que muestra la formación de la placa celular entre las futuras células hijas. Las vesículas secretoras derivadas de los aparatos de Golgi cercanos se alinearon a lo largo del plano ecuatorial (flecha) y empiezan a fusionarse una con otra. La membrana de las vesículas forma las membranas plasmáticas de las dos células hijas y el contenido de las vesículas proveerá el material que forma la placa celular que separa las células. *b*) Pasos en la formación de la placa celular como se describen en el texto. (*A*, DAVID PHILLIPS/PHOTO RESEARCHERS; *B*, TOMADA DE A. L. SAMUELS, T. H. GIDDINGS, JR. Y L. A. STAEHELIN, J CELL BIOL 130:1354, 1995; MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS RESERVADOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

la membrana plasmática de las dos células hijas adyacentes, en tanto que los productos secretores que se transportaron dentro de las vesículas contribuyen al plano celular intermedio. Una vez que la placa celular se completa, se agregan celulosa y otros materiales para producir una pared celular madura.

REVISIÓN ?

1. ¿Cómo es que los fenómenos de la profase mitótica preparan a las cromátides para la separación posterior en la anafase?
2. ¿Cuáles son algunas de las actividades del centrómero durante la mitosis?
3. Describa los fenómenos que ocurren en una célula durante la prometafase y la anafase.
4. Describa las similitudes y las diferencias en la dinámica de los microtúbulos entre la metafase y la anafase. ¿Cómo se relacionan estas diferencias con los movimientos durante las anafases A y B?
5. ¿Qué tipos de mecanismos generadores de fuerza podrían producir el movimiento de los cromosomas durante la anafase?
6. Contraste los fenómenos que ocurren durante la citocinesis en las células animales y vegetales típicas.

14.3 MEIOSIS

La producción de descendientes por reproducción sexual incluye la unión de dos células, cada una con un conjunto haploide de cromosomas. Como se explica en el capítulo 10, la duplicación del número de cromosomas en la fertilización se compensa por la reducción equivalente en el número de cromosomas en una etapa previa a la formación de los gametos. Esto se logra mediante la **meiosis**, un término acuñado en 1905 a partir de la palabra griega que significa "reducción". La meiosis asegura la producción de una fase haploide en el ciclo de la vida, y la fertilización, una fase diploide. Sin la meiosis, el número de cromosomas se duplicaría con cada generación y la reproducción sexual sería imposible.

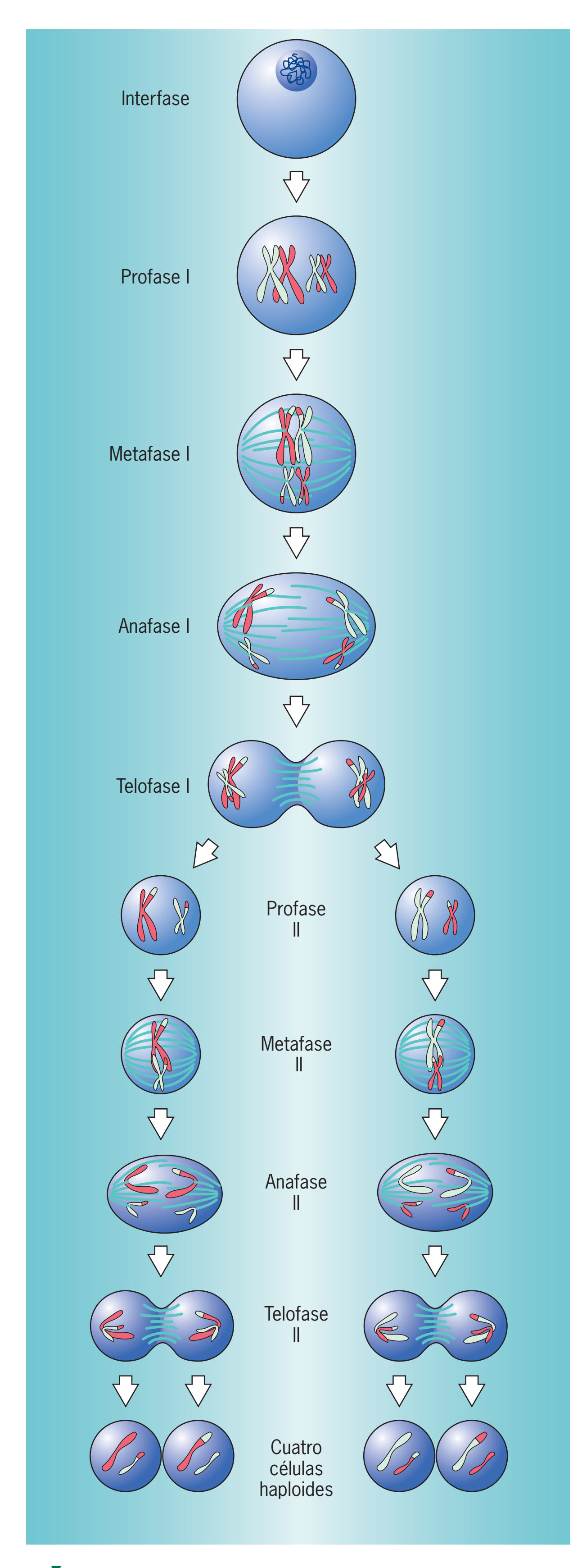


FIGURA 14-39 **Etapas de la meiosis.**

Para comparar los sucesos de la mitosis y la meiosis es necesario revisar el destino de las cromátides. Antes de la mitosis y la meiosis las células diploides en G_2 contienen pares de cromosomas homólogos, cada cromosoma formado por dos cromátides. Durante la mitosis las cromátides de cada cromosoma se dividen y separan en dos núcleos hijos por una división celular *simple*. Como resultado las células producidas por mitosis contienen pares de cromosomas homólogos y tienen características genéticas idénticas a la célula madre. En cambio, durante la meiosis las cuatro cromátides de un par de cromosomas homólogos replicados se distribuyen en cuatro núcleos hijos. En la meiosis

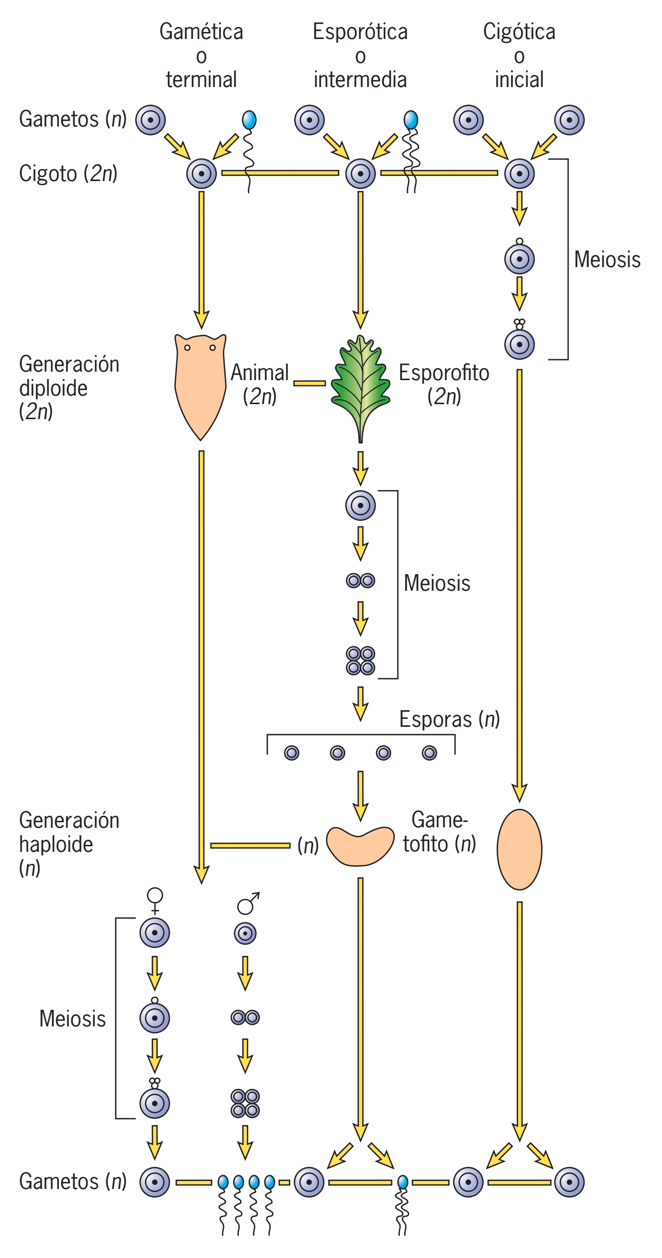
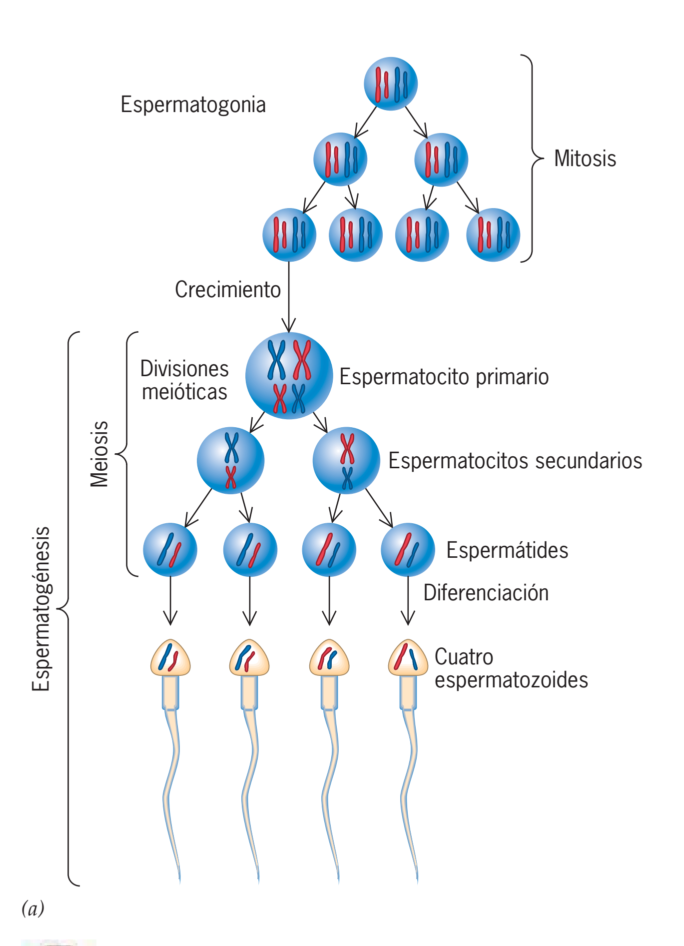


FIGURA 14-40 **Comparación de los tres grupos principales de organismos basada en la etapa del ciclo vital en que la meiosis ocurre y la duración de la fase haploide.** (ADAPTADA DE E. B. WILSON, THE CELL IN DEVELOPMENT AND HEREDITY, 3RD ED. 1925. REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE MACMILLAN PUBLISHING CO., INC.)

esto se logra mediante dos divisiones en secuencia sin una ronda intermedia de duplicación de DNA (fig. 14-39). En la primera división meiótica cada cromosoma (formado por dos cromátides) se separa de su homólogo. En consecuencia cada célula hija tiene sólo un miembro de cada par de cromosomas homólogos. Para que esto ocurra los cromosomas homólogos se emparejan durante la profase de la primera división meiótica (profase I, fig. 14-39) mediante un proceso elaborado que no tiene contraparte en la mitosis. Conforme se emparejan, los cromosomas homólogos participan en un proceso de recombinación genética que produce cromosomas con nuevas combinaciones de alelos maternos y paternos (véase metafase I, fig. 14-39). En la segunda división meiótica las dos cromátides de cada cromosoma se separan (anafase II, fig. 14-39).

Un estudio de varios eucariotas revela diferencias marcadas con respecto a la etapa del ciclo vital en que la meiosis ocurre y la duración de la fase haploide. Con estas bases pueden identificarse los tres grupos siguientes (fig. 14-40):

1. ***Meiosis gamética o terminal.*** En este grupo, que incluye todos los animales y muchos protistas, las divisiones meióticas están muy vinculadas con la formación de los gametos (fig. 14-40, izquierda). Por ejemplo, en los vertebrados machos (fig. 14-41*a*) la meiosis ocurre justo antes de la diferenciación de los espermatozoides. Las *espermatogonias* que están destinadas a pasar por la meiosis se convierten en *espermatocitos primarios*, que luego pasan por las dos divisiones de la meiosis para producir cuatro *espermátides* hasta cierto punto indiferenciadas. Cada espermátide pasa por una diferenciación compleja para convertirse en una célula espermática muy especializada (*espermatozoide*). En los vertebrados hembra (fig. 14-41*b*) las *oogonias* se convierten en *oocitos primarios*, que luego entran a una profase meiótica muy prolongada. Durante esta profase el oocito primario crece y se llena de vitelo y otros materiales. La división meiótica ocurre sólo hasta después que la diferenciación del oocito se completa (o sea, el oocito alcanzó el mismo estado que cuando es fertilizado). Los huevos de los vertebrados casi siempre se fertilizan en una etapa previa a la terminación de la meiosis (por lo general en la metafase II). La meiosis se completa después de la fertilización, mientras el espermatozoide se encuentra en el citoplasma del huevo.
2. ***Meiosis cigótica o inicial.*** En este grupo, que comprende sólo protistas y hongos, las divisiones meióticas ocurren justo des-



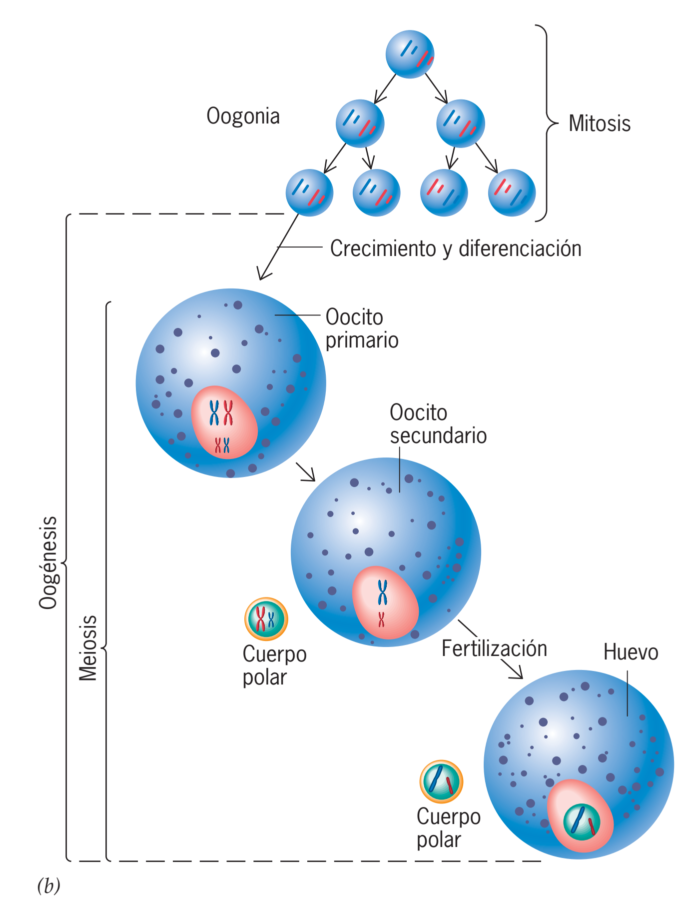


FIGURA 14-41 Etapas de la gametogénesis en los vertebrados: comparación entre la formación de espermatozoides y huevos. En ambos sexos, una población relativamente pequeña de células germinales primordiales presentes en el embrión prolifera mediante mitosis para formar una población de células germinales (espermatogonia u oogonia) a partir de las cuales se diferencian los gametos. En el macho (*a*), la meiosis ocurre antes de la diferenciación, mientras que en la hembra (*b*), ambas divisiones meióticas tienen lugar después de la diferenciación. Por lo general cada espermatocito primario da origen a cuatro gametos viables, mientras que cada oocito primario produce sólo un huevo fertilizable y dos o tres cuerpos polares.

pués de la fertilización (fig. 14-40, derecha) para producir esporas haploides. Las esporas se dividen por mitosis para producir una generación adulta haploide. Por consiguiente la etapa diploide del ciclo vital se limita a un periodo corto después de la fertilización, cuando el individuo aún es un cigoto.

3. ***Meiosis en esporas o intermedia.*** En este grupo, que abarca plantas y algunas algas, las divisiones meióticas ocurren en una etapa no relacionada con la formación de gametos ni con la fertilización (fig. 14-40, centro). Si se comienza el ciclo vital con la unión de un gameto masculino (el grano de polen) con un gameto femenino (el huevo), el cigoto diploide pasa por la mitosis y se desarrolla en un **esporofito** diploide. La *esporogénesis* (que incluye la meiosis) ocurre en alguna etapa del desarrollo del esporofito, con lo que se producen esporas que germinan de manera directa en un **gametofito** haploide. El gametofito puede ser una etapa independiente o, como en el caso de las plantas de viveros, una estructura diminuta retenida dentro de los óvulos. En cualquier caso los gametos se producen a partir del gametofito haploide por *mitosis.*

Las etapas de la meiosis

Como en la mitosis, el preludio de la meiosis incluye replicación del DNA. La fase S premeiótica tarda varias veces más que la fase S premitótica. La profase de la primera división meiótica (o sea, la profase I) suele prolongarse en forma extraordinaria en comparación con la profase mitótica. Por ejemplo, en las mujeres, los oocitos inician la profase I de la meiosis antes del nacimiento y luego entran en un periodo de paro prolongado. Los oocitos reanudan la meiosis justo antes del momento de la ovulación, que ocurre aproximadamente cada 28 días después que la mujer llega a la pubertad. Por consiguiente muchos oocitos humanos permanecen detenidos en la misma etapa aproximada de la profase durante varios decenios. La primera profase meiótica también es muy compleja y suele dividirse en varias etapas similares en todos los eucariotas con reproducción sexual (fig. 14-42).

La primera etapa de la profase I es el *leptoteno*, durante el cual los cromosomas se tornan visibles con el microscopio óptico. Aunque los cromosomas se replicaron en una etapa más temprana, no hay indicación de que cada cromosoma en realidad esté compuesto por un par de cromátides idénticas. Sin embargo, bajo el microscopio electrónico se ve que los cromosomas se componen de cromátides pares.

La segunda fase de la profase I, que se llama *cigoteno*, está marcada por una relación visible de los homólogos. Este proceso de emparejamiento de cromosomas se denomina **sinapsis** y es un fenómeno intrigante con importantes preguntas sin responder: ¿cómo se reconocen los cromosomas homólogos entre sí? ¿Cómo es que el par se alinea de manera perfecta? ¿Cuándo ocurre por primera vez el reconocimiento entre éstos? Estudios recientes arrojaron bastante información para poder responder a estas preguntas. Durante años se asumió que la interacción entre los cromosomas homólogos comienza cuando los cromosomas inician la sinapsis. Sin embargo, los estudios con células de levaduras realizados por Nancy Kleckner y sus colegas en la *Harvard University* demostraron que las regiones homólogas de DNA de los cromosomas homólogos ya están en contacto durante el leptoteno. La compactación cromosómica y la sinapsis durante el cigoteno tan sólo vuelven visible esta disposición con el microscopio. Como se explica más adelante, el primer

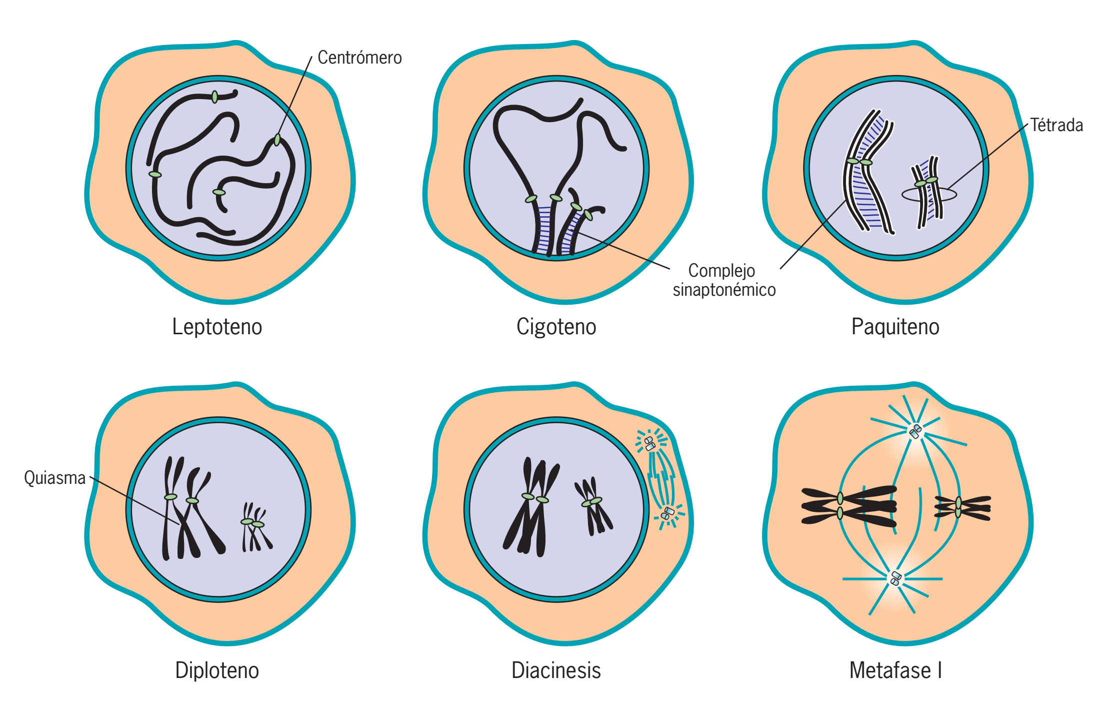


FIGURA 14-42 Etapas de la profase I: Los eventos de cada etapa se describen en el texto.

paso en la recombinación genética es la ruptura de la cadena doble en las moléculas alineadas de DNA. Los estudios con levaduras y ratones sugieren que las roturas en el DNA ocurren en el leptoteno, mucho antes que los cromosomas se emparejen en forma visible.

Estos hallazgos se apoyan con estudios enfocados en localizar secuencias particulares de DNA dentro de los núcleos de células premeióticas y meióticas. En la página 507 se vio que los cromosomas individuales ocupan regiones discretas dentro de los núcleos en lugar de dispersarse de manera aleatoria por todo el espacio nuclear. El examen de las células de levaduras que están a punto de entrar a la profase meiótica, revela que cada par de cromosomas homólogos comparte un territorio conjunto distinto de los territorios que otros pares de homólogos comparten. Este hallazgo sugiere que los cromosomas homólogos se emparejan en cierta medida antes que la profase meiótica comience. Los telómeros (segmentos terminales) de los cromosomas del leptoteno se distribuyen por todo el núcleo. Luego, cerca del final del leptoteno, hay una reorganización drástica de los cromosomas en muchas especies, de manera que los telómeros se localizan en la superficie interna de la envoltura nuclear a un lado del núcleo. La aglomeración de telómeros en un extremo de la envoltura nuclear se observa en una gran variedad de células eucariotas y ocasiona que los cromosomas se parezcan a un ramo de flores (fig. 14-43). Aún se discute si la aglomeración de telómeros ayuda o no al proceso de sinapsis.

FIGURA 14-43 Relación de los telómeros de los cromosomas meióticos con la envoltura nuclear. Cromosomas en etapa de profase meiótica del saltamontes macho; los cromosomas homólogos mantienen una relación física como parte de un bivalente. Los bivalentes se disponen en un "ramo" bien definido con sus regiones terminales aglomeradas cerca de la superficie interna de la envoltura nuclear, en la base de la fotografía. (Por cortesía de Bernard John, de B. John, Meiosis. Reimpresa con autorización de Cambridge University Press, 1990.)

Las micrografías electrónicas indican que la sinapsis cromosómica se acompaña de la formación de una estructura compleja llamada complejo sinaptonémico. El **complejo sinaptonémico** (**SC**) es una estructura similar a una escalera con filamentos de proteína transversales que conectan los dos elementos laterales (fig. 14-44). La cromatina de cada cromosoma homólogo se organiza en asas que se extienden desde uno de los elementos laterales del SC (fig. 14-44*b*). Los elementos laterales están compuestos por cohesina (pág. 583), que al parecer une la cromatina de las cromátides hermanas. Por muchos años se pensó que el SC sujetaba cada par de cromosomas homólogos en la

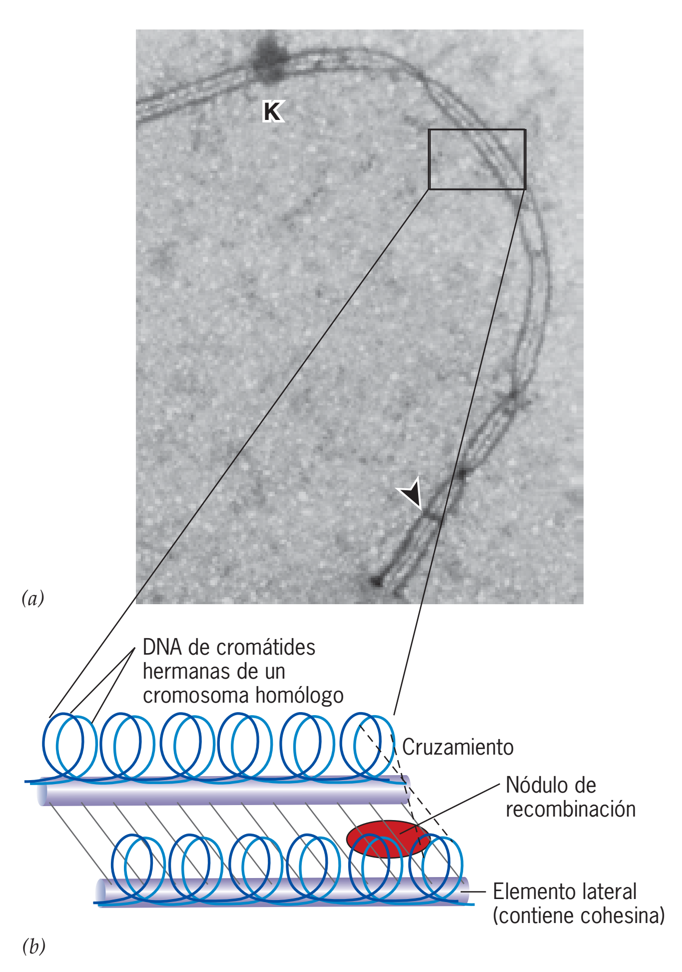


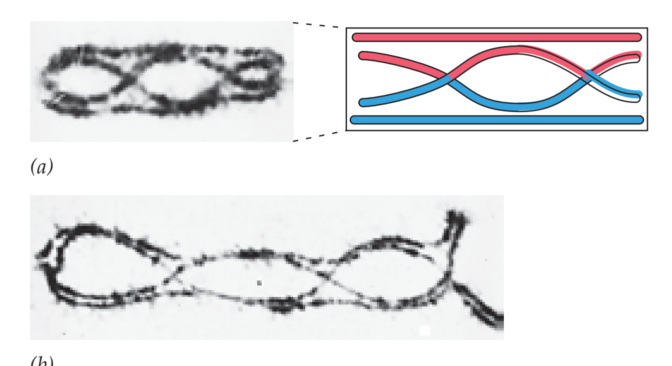
FIGURA 14-44 El complejo sinaptonémico. *a*) Micrografía electrónica de un bivalente del paquiteno humano que muestra un par de cromosomas homólogos que se mantienen en un conjunto paralelo muy ordenado. K, cinetocoro. *b*) Esquema del complejo sinaptonémico y sus fibras cromosómicas relacionadas. Los gránulos densos (nódulos de recombinación) que se ven en el centro del SC (indicados con la punta de flecha en la parte *a*) contienen la maquinaria enzimática necesaria para completar la recombinación genética, que se cree comienza en una etapa mucho más temprana en la profase I. Se muestran los rizos emparejados de DNA de las dos cromátides hermanas de cada cromosoma. Es probable que los rizos se mantengan en una configuración de parejas mediante la cohesina (no se muestra). Se supone que la recombinación genética (cruzamiento) ocurre entre las hélices de DNA de cromátides no hermanas, como se muestra. (*A*, cortesía de Alberto J. Solari, Chromosoma 81:330, 1980.)

posición correcta para iniciar la recombinación genética entre las cepas de DNA homólogo. Ahora resulta evidente que el SC no es necesario para la recombinación genética. El SC no sólo se forma después del inicio de la recombinación genética, sino que las células de levadura mutantes incapaces de ensamblar el SC pueden participar en el intercambio de información genética entre homólogos. En la actualidad se piensa que el SC funciona sobre todo como un marco que permite la interacción de las cromátides para que completen sus actividades de cruzamiento, como se describe más adelante.

El complejo formado por un par de cromosomas homólogos unidos se denomina **bivalente** o **tétrada**. El primer término refleja el hecho de que el complejo contiene dos homólogos, mientras que el último llama la atención por la presencia de cuatro cromátides. El final de la sinapsis marca el final del cigoteno y el principio de la siguiente etapa de la profase I, llamada *paquiteno*, que se caracteriza por un complejo sinaptonémico completamente formado. Durante el paquiteno los homólogos se mantienen juntos a lo largo del SC. El DNA de las cromátides hermanas se extiende en rizos paralelos (fig. 14-44). Bajo el microscopio electrónico se ven varios cuerpos electrodensos de unos 100 nm de diámetro al interior del centro del SC. Estas estructuras se denominaron *nódulos de recombinación* porque corresponden a los sitios en los que se produce el cruzamiento, como se demuestra con la síntesis relacionada de DNA que ocurre durante los pasos intermedios de la recombinación (pág. 608). Los nódulos de recombinación contienen la maquinaria enzimática que facilita la recombinación genética, que se completa al final del paquiteno.

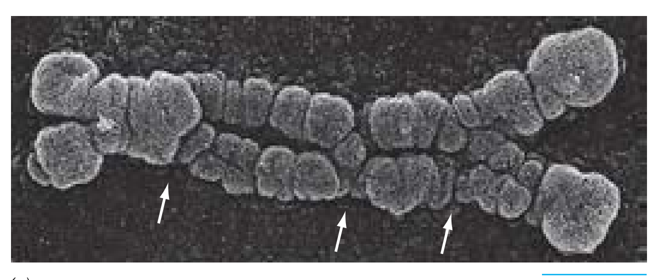
El principio del *diploteno*, la siguiente etapa de la profase I meiótica (fig. 14-42), se reconoce por la disolución del SC, que deja los cromosomas unidos entre sí en puntos específicos por estructuras con forma de X, llamadas **quiasmas** (fig. 14-45). Los quiasmas se localizan en sitios de los cromosomas en los que antes ocurrió el cruzamiento entre moléculas de DNA de los dos cromosomas. Los quiasmas se forman por las uniones covalentes entre una cromátide de un homólogo y una cromátide no hermana del otro homólogo. Estos puntos de unión brindan una interpretación visual sorprendente de la extensión de la recombinación genética. Los quiasmas se tornan más visibles por una tendencia de los homólogos a separarse uno del otro en la etapa de diploteno.

En los vertebrados el diploteno puede ser una fase muy prolongada de la oogénesis durante la cual ocurre la mayor parte del crecimiento del oocito. Por tanto el diploteno puede ser un periodo de intensa actividad metabólica. Por su enorme tamaño, los oocitos de los anfibios se prefieren como sistema para estudiar la expresión génica y la actividad metabólica durante la oogénesis. En los espermatocitos y los oocitos de anfibios (así como en muchos otros grupos), los cromosomas del diploteno se dispersan con una configuración particular que no se encuentra en ningún otro momento del ciclo vital del organismo. Estos cromosomas, que se conocen como *cromosomas plumosos* (véase fig. 12-12*b*), tienen un eje principal, del cual se extienden pares de asas en direcciones opuestas. Las asas surgen en pares porque cada cromosoma consiste en un par de cromátides duplicadas y cada asa es una proyección de una sola cromátide. El DNA situado entre las asas está muy compactado y no tiene actividad de transcripción. En cambio, el DNA de las asas está extendido y constituye el sitio de actividad de transcripción. La transcripción de los cromosomas plumosos en el oocito provee el RNA (ácido ribonucleico) que se utiliza para la síntesis de proteínas durante la oogénesis y el desarrollo embrionario temprano después de la fertilización.



(*a*)

(*b*)



(*c*) 4 μm

FIGURA 14-45 Evidencia visible de cruzamiento. *a-b*) Bivalentes del diploteno del saltamontes que muestran los quiasmas formados entre las cromátides de cada cromosoma homólogo. El recuadro indica el cruzamiento que se supone ocurrió dentro del bivalente en (*a*). Las cromátides de cada cromosoma en diploteno se mantienen muy próximas, excepto en los quiasmas. *c*) Micrografía electrónica de barrido de un bivalente de la langosta del desierto con tres quiasmas (flechas). (*A* y *B*, tomadas de Bernard John, Meiosis, Cambridge, 1990; reimpresas con autorización de Cambridge University Press; *C*, tomada de Klaus Werner Wolf, BioEss 16:108, 1994.)

Durante la etapa final de la profase I meiótica, llamada *diacinesis*, el huso meiótico se ensambla y los cromosomas se preparan para su separación. Los cromosomas se compactan de nuevo durante la diacinesis en aquellas especies en que los cromosomas se dispersan mucho durante el diploteno. La diacinesis termina con la desaparición del nucleolo, la rotura de la envoltura nuclear y el movimiento de las tétradas a la placa de la metafase. En los oocitos de vertebrados estos fenómenos se inician por un aumento en el nivel de actividad de la proteincinasa del MPF (factor promotor de maduración). Como se explica en la sección Vías experimentales al final del capítulo, el MPF se identificó por primera vez por su capacidad para iniciar estos fenómenos que representan la *maduración* del oocito (pág. 609).

En la mayoría de las especies eucariotas, los quiasmas aún pueden verse en los cromosomas homólogos alineados en la placa de la metafase de la meiosis I. De hecho los quiasmas mantienen juntos los homólogos como un elemento bivalente durante esta etapa. En los humanos y otros vertebrados cada par de éstos

suele contener por lo menos un quiasma, y los cromosomas más largos tienden a poseer dos o tres. Se cree que algún mecanismo asegura que inclusive los cromosomas más pequeños formen un quiasma. Si no se forma un quiasma entre un par de cromosomas homólogos, los cromosomas de ese bivalente tienden a separarse después de la disolución del SC. A menudo esta separación prematura de los homólogos conduce a la formación de núcleos con una cantidad anormal de cromosomas. La consecuencia de este fenómeno se trata en la sección Perspectiva humana.

En la metafase I, los dos cromosomas homólogos de cada bivalente se conectan con las fibras del huso de los polos opuestos (fig. 14-46*a*). En cambio, las cromátides hermanas están conectadas a los microtúbulos del mismo polo del huso, lo cual es posible gracias a la disposición lado a lado de sus cinetocoros, como se observa en el recuadro de la figura 14-46*a*. La orientación de los cromosomas maternos y paternos en cada bivalente de la placa de metafase I es aleatoria; el miembro materno de un bivalente particular tiene la misma probabilidad de estar dirigido a cualquier polo. En consecuencia, cuando los cromosomas homólogos se separan durante la anafase I, cada polo recibe una colección aleatoria de cromosomas maternos y paternos (véase fig. 14-39). Por tanto la anafase I es el evento citológico que corresponde a la ley de Mendel de la distribución independiente (pág. 390). Los organismos son capaces de generar una variedad de gametos casi ilimitada como resultado de la distribución independiente.

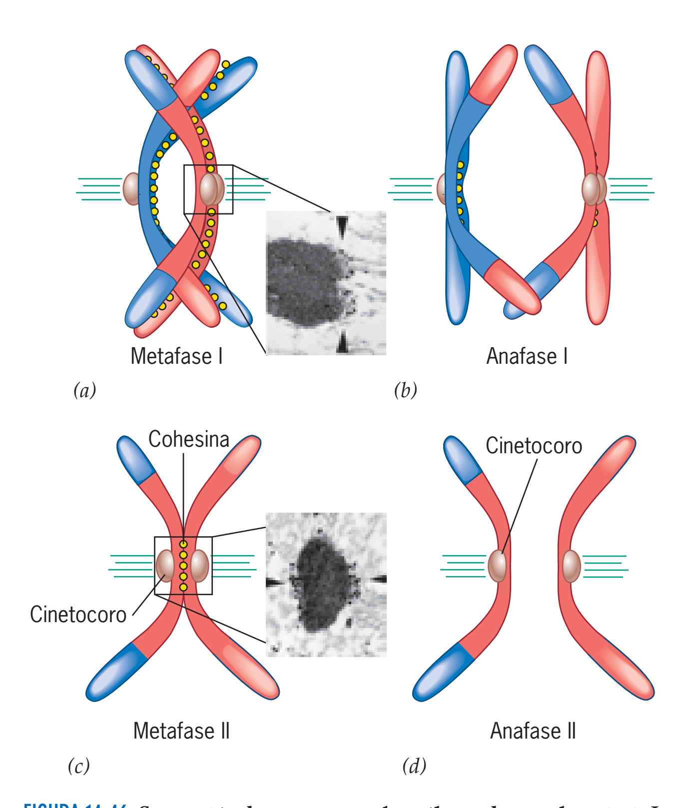


FIGURA 14-46 Separación de cromosomas homólogos durante la meiosis I y separación de cromátides durante la meiosis II. *a*) Esquema de un par de cromosomas homólogos en la metafase I. Las cromátides se mantienen unidas al nivel de los brazos y los centrómeros mediante cohesina. El par de homólogos se mantiene como bivalente por medio del quiasma. La micrografía del recuadro muestra que los cinetocoros de las cromátides hermanas están situados en un lado del cromosoma, de frente al mismo polo. Los puntos negros son partículas de oro unidas a la proteína motora CENP-E (véase fig. 14-16*c*). *b*) En la anafase I, la cohesina que sujeta los brazos de las cromátides se aleja, lo cual permite que los homólogos también se separen entre sí. La cohesina se mantiene en el centrómero, conservando juntas a las cromátides. *c*) En la metafase II, las cromátides se mantienen cerca en el centrómero, con los microtúbulos de los polos opuestos unidos a los dos cinetocoros. La micrografía del recuadro muestra que los cinetocoros de las cromátides hermanas ahora están en lados opuestos del cromosoma, de frente a polos opuestos. *d*) En la anafase II, la cohesina que mantiene unidas las cromátides ya se separó, y ello permite que los cromosomas se muevan a los polos opuestos. (Recuadros tomados de Jibak Lee, et al., Mol. Reprod. Develop. 56:51, 2000.)

Para la separación de los cromosomas homólogos en la anafase I, es necesario que los quiasmas que mantienen unido el bivalente se disuelvan. Los quiasmas se mantienen por la cohesión entre las cromátides hermanas en regiones que flanquean estos sitios de recombinación (fig. 14-46*a*). Los quiasmas desaparecen en la transición metafase I-anafase I cuando los brazos de las cromátides de cada bivalente pierden la cohesina. La pérdida de cohesión entre los brazos se debe a la división proteolítica de las moléculas de cohesina en esas regiones del cromosoma. En cambio, la cohesión entre los centrómeros unidos de las cromátides hermanas se mantiene fuerte porque la cohesina ahí situada está protegida contra el ataque proteolítico (fig. 14-46*b*). El resultado es que las cromátides hermanas permanecen unidas con firmeza mientras se mueven juntas hacia un polo del huso durante la anafase I.

La telofase I de la meiosis I produce cambios menos drásticos que la telofase de la mitosis. Aunque los cromosomas a menudo experimentan cierta dispersión, no llegan a un estado tan extendido del núcleo en interfase. La envoltura nuclear puede o no reformarse durante la telofase I. La etapa entre las dos divisiones meióticas se llama *intercinesis* y por lo general es corta. En los animales, las células que se encuentran en este estado fugaz se conocen como *espermatocitos secundarios* u *oocitos secundarios*. Estas células se caracterizan por ser haploides porque contienen sólo un miembro de cada par de cromosomas homólogos. Aunque son haploides, tienen dos veces más DNA que un gameto haploide porque cada cromosoma aún está representado por un par de cromátides hermanas. Se dice que los espermatocitos secundarios tienen una cantidad 2C de DNA, la mitad que un espermatocito primario, que tiene un contenido 4C de DNA, y dos veces más que una célula espermática, cuyo contenido de DNA es 1C.

Tras la intercinesis sigue la profase II, una profase mucho más sencilla que su predecesora. Si la envoltura nuclear se reformó en la telofase I, se rompe de nuevo. Los cromosomas se compactan otra vez y se alinean en la placa de metafase. A diferencia de la metafase I, los cinetocoros de las cromátides hermanas de la metafase II se dirigen a polos contrarios y se unen con grupos opuestos de fibras cromosómicas del huso (fig. 14-46*c*). La progresión de la meiosis en los oocitos de vertebrados se detiene en la metafase II. La detención de la meiosis en la metafase II se debe a factores que inhiben la activación de APC^{Cdc20}, lo cual impide la degradación de la ciclina B. Siempre que los niveles de ciclina B permanezcan altos dentro del oocito, la actividad Cdk se mantiene y las células no pueden avanzar a la siguiente etapa de la meiosis. El paro de la metafase II sólo se libera cuan-

do el oocito (ahora llamado huevo) se fertiliza. La fertilización conduce a una entrada rápida de iones de Ca^{2+}, la activación de APC^{Cdc20} (pág. 590) y la destrucción de la ciclina B. El huevo fertilizado responde a estos cambios con la terminación de la segunda división meiótica. La anafase II comienza con la división sincrónica de los centrómeros, que mantuvieron juntas a las cromátides hermanas, lo que les permite moverse hacia los polos contrarios de la célula (fig. 14-46*d*).

La meiosis II concluye con la telofase II, en la que los cromosomas de nuevo están encerrados por una envoltura nuclear. Los productos de la meiosis son células haploides con una cantidad 1C de DNA nuclear.

PERSPECTIVA HUMANA

Falta de disyunción meiótica y sus consecuencias

La meiosis es un proceso complejo y los errores de la meiosis en los humanos parecen ocurrir con una frecuencia sorprendente. Es posible que los cromosomas homólogos no se separen durante la meiosis I o que las cromátides hermanas no se aparten durante la meiosis II.

Primera división meiótica
Falta de disyunción
Normal
Segunda división meiótica
Normal
Normal
Normal
Falta de disyunción
Gametos con cromosoma adicional
Gametos con falta de un cromosoma
Gametos normales
Gameto con cromosoma adicional
Gameto con falta de un cromosoma

FIGURA 1 La falta de disyunción meiótica ocurre cuando los cromosomas no se separan durante la meiosis. Si la falta de separación tiene lugar durante la primera división meiótica, lo que se llama *falta de disyunción primaria*, todas las células haploides poseen una cantidad anormal de cromosomas. Si la falta de disyunción se presenta durante la segunda división meiótica, lo que se llama *falta de disyunción secundaria*, sólo se afectan dos de las cuatro células haploides. (También puede haber tipos más complejos de falta de disyunción de los que se muestran aquí.)

Cuando cualquiera de estas situaciones se presenta, se forman gametos que contienen una cantidad anormal de cromosomas, ya sea un cromosoma adicional o uno faltante (fig. 1). Si uno de estos gametos se fusiona con un gameto normal, se forma un cigoto con una cantidad anormal de cromosomas y esto tiene consecuencias graves. En la mayoría de los casos el cigoto se convierte en un embrión anormal que muere en algún momento entre la concepción y el nacimiento. Sin embargo, en algunos casos el cigoto se desarrolla hasta convertirse en un lactante cuyas células tienen un número anormal de cromosomas, lo que se conoce como *aneuploidía.* El efecto de la aneuploidía depende de cuál o cuáles cromosomas estén afectados.

El complemento cromosómico normal de los humanos es 46: 22 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales. Un cromosoma adicional (para un total de 47 cromosomas) crea una alteración denominada *trisomía* (fig. 2). Por ejemplo, la persona cuyas células contienen un cromosoma 21 adicional tiene trisomía 21. La falta de un cromosoma (para un total de 45 cromosomas) produce *monosomía.* Para empezar se considerarán los efectos de un número anormal de autosomas.

La ausencia de un cromosoma autosómico, sin importar cuál es el afectado, siempre resulta letal en alguna etapa durante el desarrollo embrionario o fetal. Por consiguiente, un cigoto que contiene una monosomía autosómica no da origen a un feto que llegue a término. Aunque podría resultar inesperado que la existencia de un cromosoma

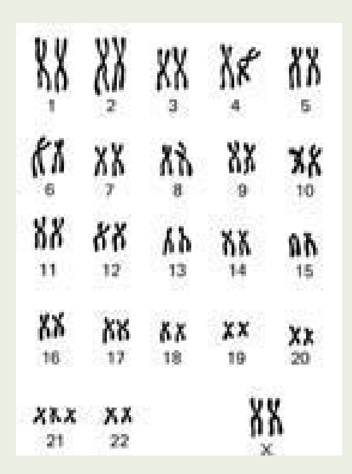


FIGURA 2 Cariotipo de una persona con síndrome de Down. El cariotipo muestra un cromosoma 21 adicional (trisomía 21).

adicional creara una situación que pusiera en riesgo la vida, el hecho es que los cigotos con trisomías no tienen un destino mucho mejor que aquellos con monosomías. De los 22 autosomas distintos en el complemento cromosómico humano, sólo las personas con trisomía 21 pueden sobrevivir después de las primeras semanas o meses de edad. Casi todas las otras trisomías posibles son letales durante el desarrollo, mientras que los fetos con trisomías de los cromosomas 13 y 18 a menudo viven hasta el parto, pero presentan anormalidades tan graves que fallecen poco después de nacer. Más de un cuarto de los fetos que terminan en aborto espontáneo tiene una trisomía cromosómica. Se cree que muchos más cigotos con cantidades anormales de cromosomas producen embriones que mueren en etapas tempranas del desarrollo antes que se reconozca siquiera el embarazo. Por ejemplo, por cada cigoto trisómico que se forma en la concepción, se presume que hay una cantidad igual de cigotos monosómicos que tienen una evolución aún peor. Se estima que hasta 20% de los oocitos humanos es aneuploide, porcentaje mucho más alto que en cualquier otra especie estudiada. Por ejemplo, los huevos de ratón casi siempre tienen un nivel de aneuploidía de 1 a 2%. Hace poco se descubrió que la exposición de los ratones a un compuesto parecido al estrógeno (el bisfenol A) que se emplea en la fabricación de compuestos de policarbonato puede incrementar mucho la frecuencia de falta de disyunción durante la meiosis en los ratones. Esta es la primera demostración clara de una relación entre los compuestos sintéticos presentes en el ambiente y la aneuploidía meiótica. No se sabe si éstos u otros agentes ambientales contribuyen al alto índice de aneuploidía en oocitos humanos. Cualquiera que sea la razón, las anormalidades cromosómicas durante la meiosis en los varones tienen un nivel mucho menor que aquellas que se presentan en las mujeres.

Aunque el cromosoma 21 es el más pequeño de los cromosomas humanos, la presencia de una copia adicional de este material genético tiene consecuencias graves y causa un trastorno llamado *síndrome de Down*. Las personas con síndrome de Down experimentan grados variables de daño mental, alteraciones en ciertos rasgos corporales, problemas circulatorios, mayor susceptibilidad a las enfermedades infecciosas y un riesgo mucho más alto de padecer leucemia y enfermedad de Alzheimer de inicio temprano. Se cree que todos estos problemas médicos se derivan de un nivel anormal de expresión de genes localizados en el cromosoma 21. Sin embargo, la expresión de genes situados en otros cromosomas también puede ser afectada por la concentración excesiva de determinados factores de transcripción codificados por genes del cromosoma 21.

La presencia de un número anormal de cromosomas sexuales es mucho menos dañina para el desarrollo humano. Un cigoto que sólo tiene un cromosoma X y no tiene un segundo cromosoma sexual (conocido como XO) se desarrolla en una hembra con *síndrome de Turner*, en el que el desarrollo genital se detiene en el estado juvenil, los ovarios no se desarrollan y la estructura corporal presenta anormalidades leves. Como un cromosoma Y determina el desarrollo masculino, las personas con por lo menos un cromosoma Y se desarrollan como varones. Un varón con un cromosoma X adicional (XXY) presenta *síndrome de Klinefelter*, que se caracteriza por retraso mental, desarrollo deficiente de los genitales y características físicas femeninas (como crecimiento mamario). Un cigoto con un cromosoma Y adicional (XYY) se convierte en un varón con características físicas normales con probabilidad de ser más alto que el promedio. Aunque surgió una controversia considerable por ciertas declaraciones que afirman que los varones XYY tienden a presentar un comportamiento más agresivo, antisocial y criminal que los varones XY, esta hipótesis aún no se comprueba.

La probabilidad de tener un hijo con síndrome de Down se incrementa mucho con la edad de la madre: de 0.05% entre mujeres de 19 años de edad a casi 3% entre las mujeres mayores de 45 años. La mayoría de los estudios muestra que la edad del padre y la probabilidad de procrear un hijo con trisomía 21 no se relacionan. Las estimaciones basadas en comparaciones de secuencias de DNA entre los hijos y los padres indican que cerca de 95% de las trisomías 21 pueden rastrearse hasta comprobar que la falta de disyunción ocurrió en la madre.

Antes se señaló que un número anormal de cromosomas puede ser el resultado de la falta de disyunción en alguna de las divisiones meióticas (fig. 1). Aunque los diferentes fenómenos de falta de disyunción producen el mismo efecto en términos de número de cromosomas en el cigoto, pueden distinguirse mediante el análisis genético. La falta de disyunción primaria transmite dos cromosomas homólogos al cigoto, mientras que la falta de disyunción secundaria transmite dos cromátides hijas (mayor probabilidad de alteración por el cruzamiento) al cigoto. Los estudios indican que casi todos los errores ocurren durante la meiosis I. Por ejemplo, en un estudio de 433 casos de trisomía 21 ocasionados por falta de disyunción maternal 373 se debieron a errores durante la meiosis I y 60 a errores en la meiosis II.

¿Por qué la meiosis I es más susceptible a la falta de disyunción que la meiosis II? La respuesta exacta no se conoce, pero es casi seguro que refleje el hecho de que los oocitos de las mujeres mayores permanecieron detenidos en la meiosis I durante mucho tiempo en el ovario. En este capítulo se mencionó que los quiasmas, que son indicadores visuales de recombinación genética, tienen una función importante para mantener juntos los bivalentes durante la metafase I. De acuerdo con una hipótesis, los husos meióticos de los oocitos más viejos tienen una menor capacidad para mantener juntos los bivalentes construidos de manera débil (bivalentes con sólo un quiasma cerca de la punta del cromosoma) que aquellos de oocitos más jóvenes, lo que aumenta la probabilidad de que los cromosomas homólogos se separen de manera defectuosa en la anafase I. Otra posibilidad es que la cohesión de cromátides hermanas, que impide que el quiasma se "deslice" por el extremo del cromosoma, no se mantenga del todo por un periodo prolongado, lo que permite que los homólogos se separen antes de tiempo.

Recombinación genética durante la meiosis

Además de reducir el número de cromosomas como lo requiere la reproducción sexual, la meiosis incrementa la variabilidad genética en una población de organismos de una generación a la siguiente. La distribución independiente permite que los cromosomas maternos y paternos se revuelvan durante la formación de los gametos, y la recombinación genética (cruce) posibilita que los alelos maternos y paternos en un cromosoma determinado se combinen también (véase fig. 14-39). Sin la recombinación genética, los alelos de un cromosoma particular permanecerían juntos generación tras generación. Al mezclar los alelos maternos y los paternos entre cromosomas homólogos, la meiosis genera organismos con genotipos y fenotipos nuevos en los que la selección natural puede actuar. La figura 10-7 ilustra un ejemplo de recombinación entre los alelos en uno de los cromosomas de la mosca de la fruta. En el capítulo 10 también se señaló que la frecuencia de recombinación entre dos alelos en un cromosoma es proporcional a la distancia entre ellos, una característica que permitió a los genetistas desarrollar mapas de las posiciones

relativas de los genes en los cromosomas en organismos que van desde las bacterias hasta los humanos.[4]

La recombinación comprende la rotura física de moléculas individuales de DNA y la ligadura de los extremos divididos de un DNA doble con los extremos divididos del doble del cromosoma homólogo. La recombinación es un proceso muy preciso que ocurre sin adición ni pérdida de un solo par de bases. Para mantener tal exactitud, la recombinación depende de secuencias de bases complementarias que existen entre una cadena sencilla de un cromosoma y la cadena homóloga de otro, como se explica más adelante. La precisión de la recombinación se asegura mejor con la participación de las enzimas para reparación del DNA que llenan los huecos que se forman durante el proceso de intercambio.

La figura 14-47 muestra un modelo simplificado de los pasos propuestos que ocurren durante la recombinación en las células eucariotas. En este modelo dos DNA dobles que están a punto de recombinarse se alinean uno junto al otro como resultado de algún tipo de *búsqueda de homología* en el que las moléculas homólogas de DNA se relacionan entre sí en preparación para la recombinación. Una vez que se alinean, una enzima (Spo11) genera una rotura en la cadena doble en uno de los DNA dobles (paso 1, fig. 14-47). Luego la brecha se ensancha (reseca) como se indica en el paso 2. La resección puede ocurrir mediante la acción de una exonucleasa 5′ → 3′ o por un mecanismo alternativo. Sin que esto importe, las cadenas rotas tienen colas de una sola cadena expuestas, cada una con una terminación 3′ OH. En el modelo que se muestra en la figura 14-47, una de las colas de una sola cadena deja su propia molécula doble e invade la molécula de DNA de una cromátide no hermana y forma enlaces de hidrógeno con la cadena complementaria en la molécula doble vecina (paso 3). En *E. coli* este proceso en el que una sola cadena invade una molécula doble homóloga y desplaza la cadena correspondiente en esa cadena doble es catalizado por una proteína multifuncional llamada *proteína RecA*. La proteína RecA se polimeriza para formar un filamento que se une a lo largo del DNA de cadena sencilla y facilita la invasión de esa cadena a una hélice doble homóloga sin cortes. Las células eucariotas tienen homólogos de RecA (p. ej., Rad51) y se cree que catalizan la invasión de cadenas. La invasión de cadenas impulsa la actividad de reparación del DNA (sección 13.3) que llena los huecos, como se muestra en el paso 4.

Como resultado del intercambio recíproco de las cadenas de DNA, las dos cadenas dobles establecen enlaces covalentes entre sí para formar una molécula conjunta (o *heterodoble*) que contiene un par de cruces de DNA, o *uniones de Holliday*, que flanquean la región de intercambio de cadenas (pasos 4 y 5, fig. 14-47). Estas uniones reciben su nombre de Robin Holliday, el investigador que propuso su existencia en 1964. No es necesario que este intermediario de la recombinación sea una estructura estática porque el punto de unión puede moverse en una u otra dirección (fenómeno conocido como *migración de rama*) mediante el rompimiento de los enlaces hidrógeno que sujetan los pares originales de cadenas para reformar los enlaces hidrógeno entre cadenas de los dobles recién unidos (paso 5). La formación de uniones de Holliday y la migración de rama tienen lugar durante el paquiteno (fig. 14-42).

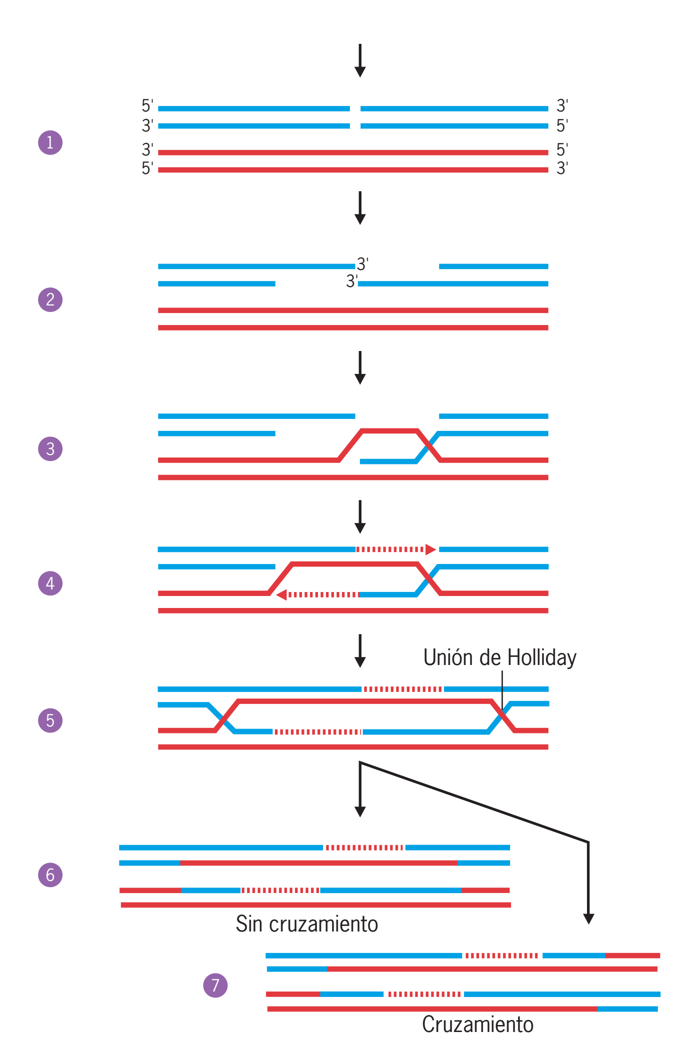


FIGURA 14-47 Mecanismo propuesto para la recombinación genética iniciada por roturas en la cadena doble. Los pasos se describen en el texto.

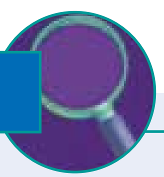
Para resolver las uniones de Holliday, que están interconectadas y restaurar el DNA a dos cadenas dobles discretas, debe ocurrir otra ronda de división del DNA. Dos productos alternativos pueden generarse según las cadenas particulares de DNA que se dividan y liguen. En un caso, las dos dobles contienen sólo fragmentos cortos de intercambio genético, lo que representa una falta de cruce (paso 6, fig. 14-47). En la vía alternativa de rotura y ligadura, la doble de una molécula de DNA se une por enlace covalente con la doble de la molécula homóloga, lo que crea un sitio de recombinación genética (es decir, un cruce) (paso 7). Estudios recientes sugieren que la decisión de que una interacción de recombinación resulte en un cruce o una falta de cruce se toma antes de la etapa en que la unión de Holliday doble se resuelva. Los cruces, que representan la fusión de un cromosoma materno y uno paterno (paso 7), se desarrollan en el quiasma necesario para mantener unidos los homólogos durante la meiosis I (pág. 604).

[4] En realidad la recombinación no es uniforme en todo el cromosoma, sino que cada cromosoma tiene "puntos calientes" en los que es más probable que la recombinación ocurra y "puntos fríos" en los que es menos probable que suceda (también se explica en la página 421). La razón de esta diferencia se desconoce.

REVISIÓN

1. Diferencie las funciones generales de la mitosis y la meiosis en la vida de una planta o un animal. ¿En qué difieren los núcleos que se forman en estos dos procesos?
2. Diferencie los eventos que suceden durante la profase I y la profase II de la meiosis.
3. Compare el marco temporal de la meiosis en la espermatogénesis y en la oogénesis.
4. ¿Cuál es la participación de las rupturas en la cadena de DNA en la recombinación genética?

VÍAS EXPERIMENTALES



Descubrimiento y caracterización del factor promotor de maduración (MPF)

Conforme un oocito de anfibio se aproxima al final de la oogénesis, el gran núcleo (llamado vesícula germinal) se mueve hacia la periferia de la célula. En los siguientes pasos la envoltura nuclear se desensambla, los cromosomas compactados se alinean en la placa de la metafase cerca de un extremo (el polo animal) del oocito y la célula presenta la primera división meiótica para producir un oocito secundario grande y un cuerpo polar pequeño. Los procesos de la rotura de la vesícula germinal y la primera división meiótica se conocen como *maduración* y pueden inducirse en oocitos crecidos por completo mediante el tratamiento con la hormona esteroide progesterona. El primer signo de maduración en el oocito de anfibio tratado con hormona se ve 13 a 18 h después del tratamiento, cuando la vesícula germinal se aproxima a la superficie del oocito. Poco después sigue la fractura de la vesícula germinal y el oocito llega a la metafase de la segunda división meiótica unas 36 h después del tratamiento hormonal. La progesterona induce la maduración sólo si se aplica al medio externo que rodea al mismo; si la hormona se inyecta en el oocito, no se observa respuesta.[1] Al parecer la hormona actúa en la superficie celular para iniciar los cambios secundarios en el citoplasma del oocito que conducen a la rotura de la vesícula germinal y los otros cambios vinculados con la maduración.

Para aprender más acerca de la naturaleza del cambio citoplásmico que induce el inicio de la maduración Yoshio Masui de la *Toronto University* y Clement Markert de la *Yale University* iniciaron una serie de experimentos en los que retiraron citoplasma de oocitos aislados de rana en varias etapas después del tratamiento con progesterona e inyectaron 40 a 60 nanolitros (nl) del citoplasma donante a oocitos inmaduros que habían completado su crecimiento y no se habían tratado con la hormona.[2] Observaron que el citoplasma tomado de los oocitos durante las primeras 12 h después del tratamiento con progesterona tenía poco o ningún efecto en los oocitos receptores. Sin embargo, luego de este periodo el citoplasma adquiría la capacidad de inducir la maduración del oocito receptor. El citoplasma del oocito donante alcanzaba su efectividad máxima unas 20 h después del tratamiento con progesterona y su efectividad disminuía a las 40 h (fig. 1). No obstante, el citoplasma tomado de los embriones tempranos aún mostraba cierta capacidad para inducir la maduración del oocito. Masui y Markert denominaron a la(s) sustancia(s) citoplásmica(s) que induce(n) la maduración en los oocitos receptores "factor promotor de la maduración", que se conoce con las siglas MPF.

Como se asumió que el MPF participaba de manera específica en la inducción de la maduración del oocito, al principio se puso relativamente poco interés en la sustancia o su posible mecanismo de acción. En 1978 William Wasserman y Dennis Smith de la *Purdue University* publicaron un informe respecto al comportamiento del MPF durante el desarrollo temprano de los anfibios.[3] Se asumía que la actividad del MPF presente en los embriones tempranos era sólo un residuo de la

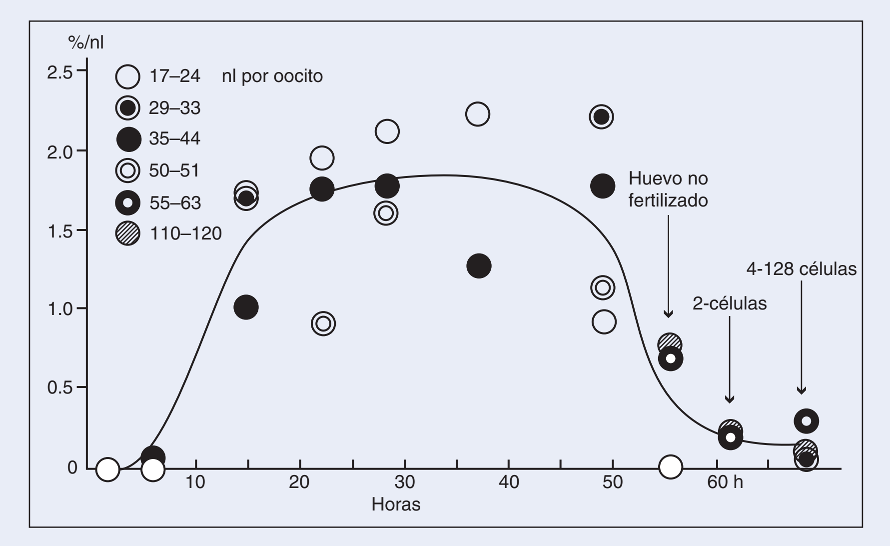


FIGURA 1 Cambio de actividad del factor promotor de la maduración en el citoplasma del oocito de *Rana pipiens* durante el transcurso de la maduración y el desarrollo temprano. Ordenadas: cociente de frecuencia de maduración inducida sobre volumen de citoplasma inyectado. A mayor cociente, más eficaz el citoplasma. nl, nanolitros de citoplasma inyectado. Abscisas: edad de los donantes (horas después de la administración de progesterona). (TOMADA DE Y. MASUI Y C. L. MARKERT, J. EXP. ZOOL. 177:142, 1971.)

actividad que había tenido en el oocito. Sin embargo, Wasserman y Smith descubrieron que la actividad del MPF tiene fluctuaciones muy importantes en la división de huevos que se relacionan con cambios en el ciclo celular. Por ejemplo, se encontró que el citoplasma tomado de huevos de rana en división en los 30 a 60 min siguientes a la fertilización contiene poca o ninguna actividad detectable de MPF, según se probó con la inyección de éste en oocitos inmaduros (fig. 2). No obstante, la actividad del MPF puede demostrarse de nuevo si el citoplasma se toma de un huevo a los 90 min de la fertilización. La actividad del MPF alcanza su nivel máximo a los 120 min después de la fertilización y comienza a declinar otra vez a los 150 min (fig. 2). En el momento en que los huevos presentan su primera citocinesis a los 180 min, no se detecta actividad en los huevos. Luego, conforme el segundo ciclo de división se produce, la actividad del MPF reaparece una vez más y alcanza su nivel máximo a los 225 min después de la fertilización para declinar a un nivel muy bajo. Se encontraron resultados similares en los huevos de *Xenopus*, excepto que las fluctuaciones en la actividad del MPF ocurren con más rapidez que en la *Rana* y se correlacionan con el ritmo más rápido de divisiones en el embrión joven de *Xenopus*. Por tanto la actividad del MPF desaparece y reaparece en ambas especies de anfibio con una escala temporal que se relaciona con la duración del ciclo celular. En ambas especies el pico de la actividad del MPF corresponde al tiempo de rotura de la membrana nuclear y a la entrada de las células en la mitosis. Estos hallazgos sugirieron que el MPF hace más que sólo controlar el momento de la maduración del oocito y que de hecho es probable que desempeñe una función clave en la regulación del ciclo celular de las células que se dividen.

Al mismo tiempo se hizo evidente que la actividad del MPF no se limita a los huevos de anfibio y oocitos, sino que está presente en una gran variedad de organismos. Por ejemplo, se encontró que las células de mamíferos que crecen en cultivo también poseen actividad del MPF, probada por la capacidad de los extractos de células de mamíferos para inducir la rotura de la vesícula germinal cuando se inyecta en oocitos de anfibio.[4] La actividad del MPF en las células de mamíferos fluctúa con el ciclo celular, tal como sucede en los huevos de anfibio en proceso de división. Los extractos de células HeLa cultivadas preparados con células en fase G_1 temprana, en G_1 tardía o en fase S carecen de actividad de MPF (fig. 3). El MPF aparece en el periodo G_2 temprano, se eleva de manera notable al final de G_2 y alcanza su pico máximo en la mitosis.

Otro elemento de la maquinaria que regula el ciclo celular se descubrió en estudios con embriones de erizo de mar. Los huevos de este equinoideo son sujetos favoritos de estudio de la división celular porque las divisiones mitóticas después de la fertilización ocurren con rapidez y están separadas por intervalos muy predecibles. Si los huevos de erizo de mar se fertilizan en agua de mar que contenga un inhibidor de la síntesis proteica, los huevos no inician la primera división mitótica, se detienen en una etapa previa a la compactación de cromosomas y la rotura de la envoltura nuclear. Asimismo cada una de las divisiones mitóticas posteriores puede bloquearse si se agrega un inhibidor de la síntesis de proteínas al medio en el momento previo a la división esperada. Este hallazgo sugirió que una o más proteínas deben sintetizarse durante cada uno de los ciclos celulares tempranos para que la división mitótica pueda producirse. No obstante, los estudios iniciales respecto a la división de huevos de erizo de mar no revelan la aparición de una nueva especie de proteínas durante este periodo.

En 1983, Tim Hunt y sus colegas del Laboratorio de Biología Marina de Woods Hole publicaron un documento referente a varias proteínas que se sintetizan en huevos fertilizados de erizo de mar, pero no en huevos sin fertilizar.[5] Para estudiar mejor estas proteínas, se incu-

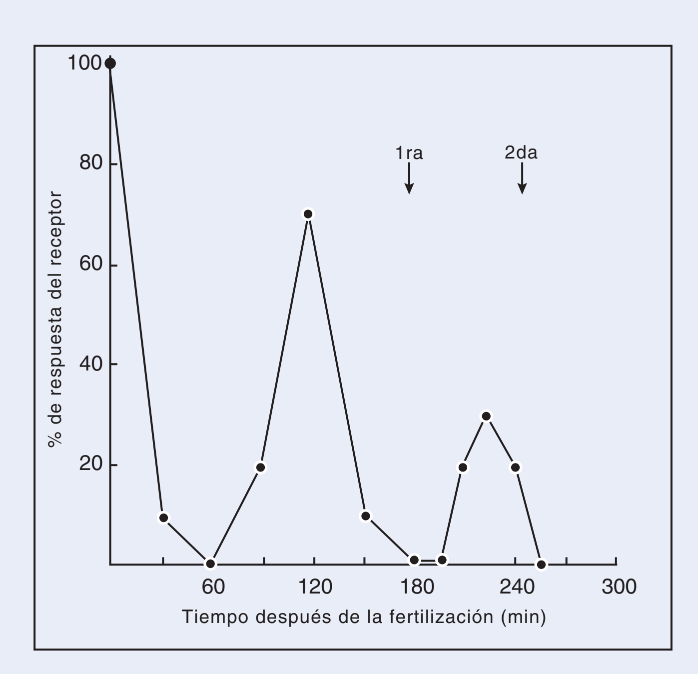


FIGURA 2 Ciclo de la actividad del MPF en huevos fertilizados de *R. pipiens.* Ordenadas: porcentaje de oocitos receptores que se someten a la descomposición de la vesícula germinal como respuesta a 80 nl de citoplasma de huevos fertilizados. Abscisas: tiempo después de la fertilización cuando el citoplasma de huevos de *Rana* se probó para buscar actividad del MPF. Las flechas indican el tiempo de las divisiones. (Tomada de W. J. Wasserman y L. D. Smith, J Cell Biol 78:R17, 1978; mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

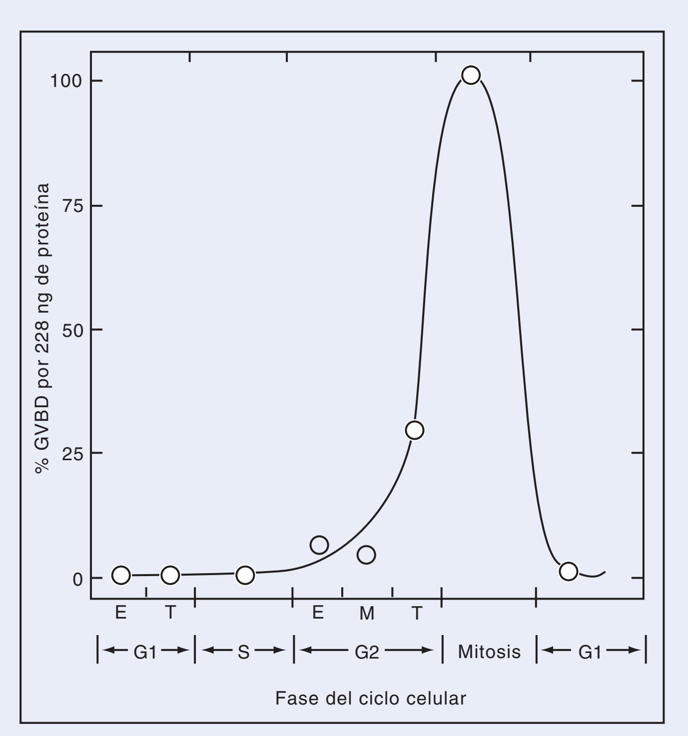


FIGURA 3 Actividad promotora de maduración de extractos de células HeLa durante diferentes etapas del ciclo celular. Como 228 ng de proteína mitótica indujeron la rotura de la vesícula germinal (GVBD) en 100% de los casos, la actividad porcentual para otras fases del ciclo celular se normalizó según la cantidad de proteína. E, temprana; M, media; T, tardía. (Tomada de P. S. Sunkara, D. A. Wright y P. N. Rao, Proc Nat'l Acad Sci U.S.A. 76:2801, 1979.)

baron huevos fertilizados en agua marina que contenía [^{35}S]metionina y obtuvieron muestras a intervalos de 10 min a partir de los 16 min después de la fertilización. Se prepararon extractos crudos de proteína con las muestras y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida; las proteínas marcadas se localizaron por autorradiografía. Varias bandas prominentes se marcaron en el gel de los extractos de huevos fertilizados que no eran evidentes en los extractos comparables preparados a partir de huevos no fertilizados. Una de las bandas que apareció con una marca intensa en las etapas tempranas tras la fertilización desapareció del gel 85 min después de la fertilización, lo que sugiere que la proteína se degradó en forma selectiva. Esta misma banda reapareció más tarde en una muestra tomada a los 127 min después de la fertilización. Las fluctuaciones en la cantidad de esta proteína se trazaron en la figura 4 (banda de proteína A) junto con el índice de separación, que señala el tiempo de las primeras dos divisiones celulares. La degradación de la proteína ocurre casi en el momento en que las células pasan por la primera y segunda divisiones. Una proteína similar se encontró en los huevos de la almeja de litoral, otro invertebrado cuyos huevos son muy estudiados. Hunt y sus colegas nombraron "ciclina" a esta proteína y señalaron el sorprendente paralelismo del comportamiento entre las fluctuaciones en los niveles de ciclinas en su investigación y la actividad del MPF en los estudios anteriores. Estudios ulteriores mostraron que había dos ciclinas distintas, A y B, que se degradan en momentos distintos durante el ciclo celular. La ciclina A se degrada durante el periodo de 5 a 6 min justo antes de la transición metafase-anafase, y la ciclina B se degrada unos cuantos minutos después de esta transición. Estos estudios proporcionaron la primera indicación de la importancia de la proteólisis controlada (pág. 575) en la regulación de una actividad celular importante.

El primer vínculo claro entre la ciclina y el MPF lo demostraron Joan Ruderman y sus colegas en el Laboratorio de Biología Marina de Woods Hole.[6] En estos estudios se transcribió in vivo un RNA mensajero que codificaba la ciclina A, a partir de un fragmento clonado de DNA que contenía toda la secuencia para codificar la ciclina A. La identidad de este mRNA se comprobó mediante su traducción in vitro y se observó que codifica ciclina A auténtica de almeja. Cuando el mRNA sintético de ciclina se inyectó en oocitos de *Xenopus*, las células presentaron rotura de la vesícula germinal y compactación cromosómica en un intervalo similar al inducido con el tratamiento con progesterona (fig. 5). Estos resultados sugirieron que el incremento en la ciclina A, que en condiciones normales se presenta durante la meiosis y la mitosis, tiene una participación directa en la promoción de la entrada a la fase M. La cantidad de ciclina A cae con rapidez y debe sintetizarse de nuevo antes de la siguiente división, de lo contrario las células no podrían ingresar a la fase M.

Pero, ¿cuál es la relación entre las ciclinas y el MPF? Una de las dificultades para responder esta pregunta fue el uso de diferentes organismos. El MPF se estudió sobre todo en anfibios, y las ciclinas, en erizos de mar y almejas. La evidencia indicaba que los oocitos de rana contienen una reserva de moléculas precursoras inactivas de MPF que se convierten en MPF activo durante la meiosis I. Por otro lado, la ciclina está ausente de los oocitos de almeja, pero aparece poco después de la fertilización. Ruderman consideró la posibilidad de que la ciclina A fuera un activador del MPF. Más adelante se retoma este asunto.

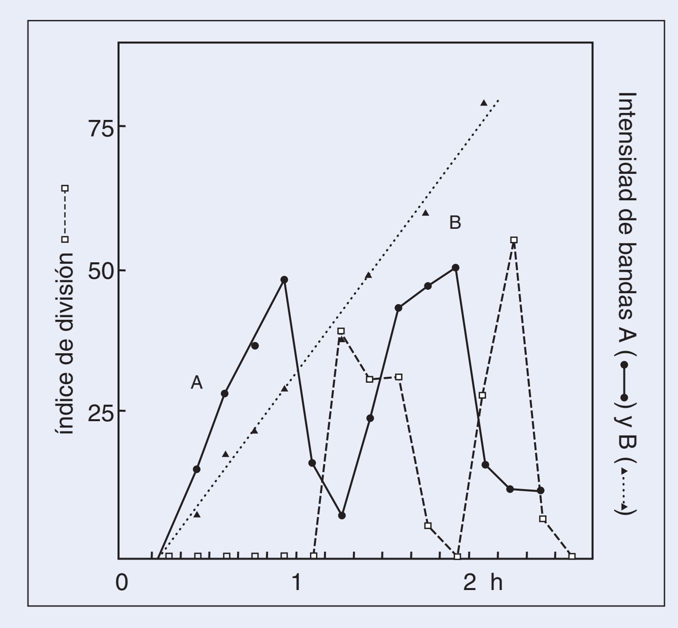


FIGURA 4 Correlación del nivel de ciclina con el ciclo de división celular. Se fertilizó una suspensión de huevos y después de 6 min se agregó [^{35}S]metionina. Se tomaron muestras para análisis mediante electroforesis en gel a intervalos de 10 min, a partir de 16 min después de la fertilización. La autorradiografía del gel electroforético se exploró para marcar la densidad y se trazó una gráfica con los datos. La proteína A, que varía de acuerdo con el ciclo celular y se llama ciclina, se muestra como círculos negros. La proteína B (que no debe confundirse con la ciclina B) no muestra fluctuación durante el ciclo celular y se graficó como triángulos oscuros. El porcentaje de células que presentan división en cualquier periodo determinado se presenta como el índice de división (cuadros huecos). (Tomada de T. Evans et al., Cell 33:391, 1983; con autorización de Cell Press.)

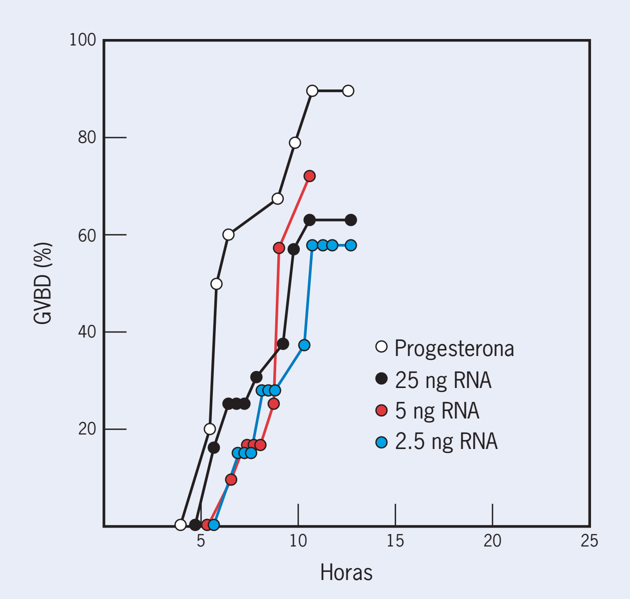


FIGURA 5 Cinética de la activación del oocito de *Xenopus* con progesterona y mRNA de ciclina A. Se aislaron oocitos grandes e inmaduros de los fragmentos de ovarios y se incubaron con progesterona o se les aplicó una microinyección con cantidades variables de mRNA de ciclina A. Tres a 4 h después de la inyección se retiraron los oocitos con daño evidente (unos dos a cuatro por cada grupo inicial de 20) y se permitió que los restantes (que representan 100% del valor) se desarrollaran. La rotura de la vesícula germinal (GVBD) y la activación del oocito se indicaron mediante la formación de un punto blanco en la región del polo animal y se confirmaron con la disección de los oocitos. (Tomada de K. I. Swenson, K. M. Farrell y J. V. Ruderman, Cell 47:865, 1986; con autorización de Cell Press.)

Mientras tanto se inició otra línea de investigación para purificar y caracterizar la sustancia con actividad de MPF. En 1980, Michael Wu y John Gerhart de la *California University* en Berkeley realizaron una purificación de 20 a 30 veces del MPF mediante la precipitación de la proteína en sulfato de amonio para someter luego el material disuelto otra vez a cromatografía por columnas. Además de estimular la maduración del oocito, las inyecciones del MPF parcialmente purificado estimularon la incorporación de ^{32}P en las proteínas del oocito de anfibio.[7] Cuando las preparaciones parcialmente purificadas de MPF se incubaron con [^{32}P]ATP in vitro, las proteínas presentes en la muestra se fosforilaron, lo que sugiere que el MPF induce la maduración mediante su acción como proteincinasa.

Al final el MPF se purificó en 1988 por medio de una serie de seis pasos cromatográficos sucesivos.[8] La actividad del MPF en estas preparaciones purificadas siempre se relacionó con dos polipéptidos: uno con masa molecular de 32 kDa y el otro de 45 kDa. La preparación purificada del MPF tenía una intensa actividad de proteincinasa, como se comprobó por la incorporación de radiactividad de [^{32}P]ATP en las proteínas. Cuando la preparación purificada se incubó en presencia de [^{32}P]ATP, el polipéptido de 45 kDa se marcó.

Para finales del decenio de 1980 los esfuerzos por descubrir la función de las ciclinas y el MPF comenzó a fusionarse con otra línea de investigación que Paul Nurse y sus colegas de la *Oxford University* que trabajaban en las levaduras con fisión.[9] Estaba demostrado que las levaduras producían una proteincinasa con un peso molecular de 34 kDa cuya actividad era necesaria para que estas células ingresaran a la fase M (descrito en la pág. 574). La proteína de las levaduras se llamó $p34^{cdc2}$ o sólo cdc2. La primera evidencia de un vínculo entre cdc2 y el MPF se obtuvo como resultado de la colaboración entre los grupos de investigación con levaduras y con anfibios.[10,11] Hay que recordar que ya se mencionó un estudio previo en el que se encontró que el MPF contiene una proteína de 32 kDa y otra de 45 kDa. Se demostró que los anticuerpos formados contra cdc2 a partir de las levaduras con fisión reaccionan de manera específica con el componente de 32 kDa del MPF aislado de los huevos de *Xenopus*. Estos hallazgos indican que este componente del MPF es un homólogo de la proteincinasa de 34 kDa de las levaduras y por tanto que la maquinaria que controla el ciclo celular en las levaduras y en los vertebrados contiene componentes que se han conservado en el curso de la evolución.

Un estudio similar que utilizó anticuerpos contra cdc2 de levaduras mostró que la proteína homóloga en los vertebrados no experimenta fluctuaciones durante el ciclo.[12] Esto apoya la proposición de que la proteincinasa de 32 kDa de las células de vertebrados depende de otra proteína. Se predijo que el modulador es la ciclina, cuya concentración se eleva durante cada ciclo celular y luego se destruye cuando la célula ingresa a la anafase. Esta propuesta se comprobó más tarde en varios estudios en los que se purificó MPF de anfibios, almejas y estrellas de mar, y se analizó su composición polipeptídica.[13-15] En todos estos casos se demostró que el MPF activo presente en las células animales en fase M es un complejo formado por dos tipos de subunidades: 1) una subunidad de 32 kDa que contiene el sitio con actividad de proteincinasa y es homólogo a la proteincinasa cdc2 de las levaduras y 2) una subunidad más grande (45 kDa) identificada como una ciclina y cuya presencia es necesaria para la actividad de proteincinasa. Los estudios descritos en esta Vía experimental proporcionaron una visión unificada del ciclo celular en todos los organismos eucariotas. También establecieron las bases para el análisis de los numerosos factores que controlan la actividad del MPF (cdc2) en varios puntos durante los ciclos celulares de levaduras y mamíferos, que se convirtieron en el centro de atención en los últimos años. Los hallazgos más importantes de estos estudios recientes se describen en la primera sección de este capítulo.

Referencias

1. Smith, L. D. & Ecker, R. E. 1971. The interaction of steroids with *R. pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev. Biol.* 25:233–247.
2. Masui, Y. & Markert, C. L. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177: 129–146.
3. Wasserman, W. J. & Smith, L. D. 1978. The cyclic behavior of a cytoplasmic factor controlling nuclear membrane breakdown. *J. Cell Biol.* 78:R15–R22.
4. Sunkara, P. S., Wright, D. A., & Rao, P. N. 1979. Mitotic factors from mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 76:2799–2802.
5. Evans, T., et al. 1983. Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33:389–396.
6. Swenson, K. I., Farrell, K. M., & Ruderman, J. V. 1986. The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* 47:861–870.
7. Wu, M. & Gerhart, J. C. 1980. Partial purification and characterization of the maturation-promoting factor from eggs of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 79:465–477.
8. Lohka, M. J., Hayes, M. K., & Maller, J. L. 1988. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 85:3009–3013.
9. Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344:503–507.
10. Gautier, J., et al. 1988. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc* 21. *Cell* 54:433–439.
11. Dunphy, W. G., et al. 1988. The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 54:423–431.
12. Labbe, J. C., et al. 1988. Activation at M-phase of a protein kinase encoded by a starfish homologue of the cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* 335:251–254.
13. Labbe, J. C., et al. 1989. MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *EMBO J.* 8:3053–3058.
14. Draetta, G., et al. 1989. cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: Evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell* 56:829–838.
15. Gautier, J., et al. 1990. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* 60:487–494.

SINOPSIS

Las etapas por las que una célula pasa de una división celular a la siguiente constituyen el ciclo celular. El ciclo celular se divide en dos fases principales: fase M, que incluye el proceso de mitosis, en el que los cromosomas duplicados se separan en dos núcleos, y la citocinesis, en la que toda la célula se divide en dos células hijas; la segunda fase del ciclo celular es la interfase. Por lo general la interfase es mucho más larga que la fase M y se subdivide en tres fases distintas según el momento de la replicación, que se limita a un periodo definido dentro del ciclo celular. G_1 es el periodo que sigue a la mitosis y precede a la replicación; S es el lapso durante el que ocurre la síntesis de DNA (y la síntesis de histonas), y G_2 es el periodo siguiente a la replicación y previo al inicio de la mitosis. La duración del ciclo celular, y las fases que lo constituyen,

varían mucho de un tipo celular a otro. Determinados tipos de células diferenciadas de manera terminal, como las fibras de músculo esquelético y las células nerviosas de los vertebrados, han perdido su capacidad de dividirse (pág. 571).

Estudios iniciales mostraron que la entrada de una célula en la fase M es desencadenada por la activación de la proteincinasa llamada MPF (factor promotor de la maduración). El MPF consiste en dos subunidades: una subunidad catalítica que transfiere grupos fosfato a residuos específicos de serina y treonina de sustratos proteicos específicos, y una subunidad reguladora que consiste en un miembro de una familia de proteínas denominadas ciclinas. La subunidad catalítica se llama proteincinasa dependiente de ciclina (Cdk). Cuando la concentración de ciclina es baja, esta enzima carece de la subunidad ciclina y permanece inactiva. Cuando la concentración de ciclina alcanza el nivel suficiente, la proteincinasa se activa, lo que desencadena el ingreso de la célula a la fase M (pág. 573).

Las actividades que controlan el ciclo celular se enfocan sobre todo en dos puntos: la transición entre G_1 y S, y la transición entre G_2 y el inicio de la mitosis. El paso por cada uno de estos puntos requiere la activación transitoria de una Cdk por una ciclina específica. En las levaduras, la misma Cdk se activa tanto en G_1-S como en G_2-M, pero se estimula con diferentes ciclinas. Las concentraciones de las diversas ciclinas aumentan y disminuyen durante el ciclo celular como resultado de cambios en la rapidez de síntesis y destrucción de las moléculas proteínicas. Además de la regulación con las ciclinas, la actividad de la Cdk también se controla por el estado de fosforilación de la subunidad catalítica, que en las levaduras está controlado a su vez por al menos dos cinasas (CAK y Wee1) y una fosfatasa (Cdc25). En las células de mamíferos hay por lo menos ocho ciclinas distintas y media docena de Cdk diferentes que participan en la regulación del ciclo celular (pág. 574).

La célula posee controles de retroalimentación que vigilan el estado de los fenómenos del ciclo celular, como la replicación y la compactación de cromosomas, y determinan si el ciclo celular continúa o no. Si una célula se somete a tratamientos que dañan el DNA, el avance del ciclo celular se retrasa hasta que el daño se repara. El paro de la célula en uno de los puntos de revisión del ciclo celular se efectúa por la acción de inhibidores cuya síntesis es estimulada por sucesos como el daño del DNA. Una vez que la célula ha sido estimulada por agentes externos para pasar por el punto de revisión G_1-S e iniciar la duplicación, la célula por lo general continúa a través del resto de la mitosis sin mayor estimulación externa (pág. 577).

La mitosis asegura que los dos núcleos hijos reciban un complemento íntegro y equivalente de material genético. La mitosis se divide en profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. La profase se caracteriza por la preparación de los cromosomas para la separación y el ensamble de la maquinaria necesaria para el movimiento de los cromosomas. Los cromosomas mitóticos son estructuras cilíndricas muy compactadas. Puede verse cómo cada cromosoma mitótico se divide en sentido longitudinal en dos cromátides, que son duplicadas y se forman mediante la replicación durante la fase S previa. El estrechamiento principal del cromosoma mitótico marca el centrómero, que aloja una estructura plana, el cinetocoro, al cual se unen los microtúbulos del huso. Durante la formación del huso, los centrosomas se alejan entre sí hacia los polos. Mientras esto ocurre los microtúbulos que se extienden entre ellos aumentan en número y longitud. Por último, los dos centrosomas llegan a puntos opuestos en la célula y los dos polos se establecen. Varios tipos de células, entre ellas las vegetales, ensamblan un huso mitótico en ausencia de centrosomas. El final de la profase está marcado por la rotura de la envoltura nuclear (pág. 579).

Durante la prometafase y la metafase, los cromosomas individuales se unen primero con los microtúbulos del huso que surgen de ambos polos y luego se mueven hacia un plano en el centro del huso. Al principio de la prometafase, los microtúbulos del huso en formación penetran en la región donde estuvo el núcleo y establecen uniones con los cinetocoros de los cromosomas condensados. Poco después los cinetocoros forman relaciones estables con los extremos más de los microtúbulos cromosómicos en ambos polos del huso. Al final cada cromosoma se pone en posición en el plano al centro del huso, un proceso que se acompaña de acortamiento de algunos microtúbulos por la pérdida de subunidades de tubulina y la elongación de otros a causa de la adición de subunidades. Una vez que los cromosomas se alinean de manera estable, la célula llegó a la metafase. El huso mitótico de una célula animal típica en metafase consiste en microtúbulos astrales, que irradian a partir del centrosoma; microtúbulos cromosómicos, que se unen con los cinetocoros, y microtúbulos polares que se extienden desde el centrosoma hasta más allá de los cromosomas y forman una canasta estructural que mantiene la integridad del huso. Los microtúbulos del huso de la metafase tienen una actividad dinámica, como lo demuestra el movimiento dirigido de las subunidades con marca fluorescente (pág. 586).

Durante la anafase y la telofase, las cromátides hermanas se separan una de la otra para dirigirse a regiones distintas de la célula en división; los cromosomas regresan a su condición de interfase. La anafase comienza cuando las cromátides hermanas se separan; esta separación es provocada por un proceso que es activado por la destrucción de la cohesina y el proceso está mediado por ubiquitina, un complejo proteico que mantiene unidas a las cromátides hermanas. Los cromosomas separados se mueven luego hacia sus polos respectivos y al mismo tiempo se observa acortamiento de los microtúbulos cromosómicos unidos, lo que se debe a la pérdida neta de subunidades tanto en los polos como en el cinetocoro. El movimiento de los cromosomas, que se denomina anafase A, suele acompañarse del alargamiento del huso mitótico y la posterior separación de los polos, a lo que se da el nombre de anafase B. La telofase se caracteriza por el restablecimiento de la envoltura nuclear, la dispersión de los cromosomas y la reformación de las redes citoplásmicas membranosas (pág. 590).

La citocinesis, que es la división del citoplasma en dos células hijas, ocurre por estrechamiento en las células animales y por construcción en las células vegetales. Las células animales se constriñen en dos mediante una indentación o surco que se forma en la superficie de la célula y luego se profundiza. El surco creciente contiene una banda de filamentos de actina que al parecer se deslizan uno sobre otro impulsados por pequeños filamentos de miosina II que generan la fuerza necesaria. Se piensa que el sitio de la citocinesis se selecciona por una señal que se difunde a partir del huso mitótico. Las células vegetales realizan la citocinesis mediante la construcción de una membrana celular y una pared celular en un plano que se encuentra entre los dos polos. El primer signo de la formación de la placa celular es la aparición de grupos de microtúbulos que se entrelazan y de material electrodenso intercalado. Después vesículas pequeñas se desplazan a la región y se alinean en un plano. Las vesículas se fusionan entre sí para formar una red membranosa que se transforma en una placa celular (pág. 596).

La meiosis es un proceso que incluye dos divisiones nucleares en secuencia, con lo que se obtienen núcleos hijos haploides que contienen sólo un miembro de cada par de cromosomas homólogos, por lo que el número de cromosomas se reduce a la mitad. La meiosis puede ocurrir en distintas etapas del ciclo vital, según el tipo de organismo. Un proceso elaborado de emparejamiento de cromosomas que no tiene contraparte en la mitosis ocurre durante la profase I para asegurar que cada núcleo hijo tenga sólo un conjunto de homólogos. El emparejamiento de los cromosomas se acompaña de la formación de una estructura proteinácea similar a una escalera que se denomina complejo sinaptonémico (SC). La cromatina de cada homólogo establece una relación íntima con una de las barras laterales del SC. Durante la profase I los cromosomas homólogos participan en la recombinación genética que produce cromosomas con nuevas combinaciones

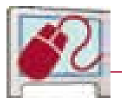
de alelos maternos y paternos. Tras la recombinación, los homólogos permanecen unidos entre sí en puntos específicos llamados quiasmas, que representan sitios de recombinación. Los homólogos emparejados (llamados bivalentes o tétradas) se orientan en la placa de la metafase de manera que ambas cromátides de un cromosoma se dirigen hacia el mismo polo. Durante la anafase I los cromosomas homólogos se separan uno del otro, y los cromosomas maternos y paternos de cada tétrada se separan en forma independiente. Las células, que ahora tienen un contenido cromosómico haploide, continúan hacia la segunda división meiótica, durante la cual las cromátides hermanas de cada cromosoma se separan en los distintos núcleos hijos (pág. 599).

La recombinación genética durante la meiosis es resultado de la rotura y la reunión de cadenas de DNA de diferentes homólogos de una tétrada. Durante la recombinación las regiones homólogas de diferentes cadenas de DNA se intercambian sin adición o pérdida de un solo par de bases. En un paso inicial, dos dobles se alinean una junto a la otra. Una vez alineadas, se producen las roturas en ambas cadenas de una de las dobles. En los pasos siguientes la cadena de DNA de un doble invade el otro doble, con lo que se forma una estructura interconectada. Los pasos siguientes pueden incluir la actividad de nucleasas y polimerasas para crear y llenar todos los huecos en las cadenas, de manera similar a como se repara el DNA (pág. 607).

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. ¿De qué manera la división celular constituye un vínculo entre los humanos y las células eucariotas más primitivas?
2. ¿Qué tipo de fenómenos sintéticos se esperaría que ocurrieran en G_1 que no ocurren en G_2?
3. Supóngase que se marca una población de células que crecen en forma asincrónica con [^{3}H]timidina. G_1 dura 6 h, S dura 6 h, G_2 dura 5 h y M, 1 h. ¿Qué porcentaje de células estarían marcadas después de un pulso de 15 min? ¿Qué porcentaje de células mitóticas estarían marcadas después de un pulso así? ¿Cuánto tiempo tendrían que vigilarse estas células antes de ver algún cromosoma mitótico marcado? ¿Qué porcentaje de las células tendrían cromosomas mitóticos marcados si las células se siguieran durante 18 h?
4. Supóngase que se toma un cultivo de las mismas células usadas en la pregunta previa, pero en lugar de marcarlas con [^{3}H]timidina en pulsos, se marcan de manera continua durante 20 h. Trace una gráfica que muestre la cantidad de DNA radiactivo que se encontraría en el cultivo en el periodo de 20 h. ¿Cuál sería el tiempo mínimo necesario para asegurar que todas las células tengan alguna marca incorporada en este experimento? ¿Cómo podría conocerse la duración del ciclo celular en este cultivo sin usar la marca radiactiva?
5. La fusión de células en G_1 con células en la fase S produce resultados diferentes a la fusión de una célula en fase G_2 con una en fase S. ¿Cuál se esperaría que fuera la diferencia y cómo puede explicarse?
6. La figura 14-6 muestra el efecto de las mutaciones que tienen los genes que codifican Wee1 y Cdc25 en el ciclo celular. La cinasa CAK se identificó por medios bioquímicos y no genéticos (o sea, por aislamiento de células mutantes). ¿Qué fenotipo se esperaría en una célula de levadura portadora de una mutación en CAK sensible a la temperatura después de elevar la temperatura del medio de cultivo en la etapa inicial de G_1?, ¿y en la parte tardía de G_2? ¿Por qué sería diferente según la etapa en la que la temperatura se elevara?
7. Mencionar cuatro mecanismos distintos por los que una Cdk puede desactivarse.
8. Un sincitio es una "célula" que contiene más de un núcleo; los ejemplos incluyen la fibra muscular esquelética y una blástula del embrión de mosca. Estos dos tipos de sincitio se originan de maneras muy distintas. ¿Cuáles son los mecanismos que podrían conducir a la formación de tales sincitios? ¿Qué dice esto respecto a la relación entre la mitosis y la citocinesis?
9. ¿Cómo podría averiguarse de manera experimental si los microtúbulos polares se encuentran en un estado de flujo dinámico durante la anafase? Al conocer los fenómenos que ocurren durante esta etapa, ¿qué se esperaría encontrar?
10. Si se agregara [^{3}H]timidina a una célula que está en replicación (fase S) antes de iniciar la meiosis, ¿qué porcentaje de los cromosomas de los gametos producidos estarían marcados? Si uno de estos gametos (un espermatozoide) fertilizara un huevo no marcado, ¿qué porcentaje de los cromosomas de la etapa de dos células estarían marcados?
11. Si el número haploide de cromosomas en humanos es 23 y la cantidad de DNA nuclear en un espermatozoide es 1C, ¿cuántos cromosomas tiene una célula humana en las siguientes etapas: metafase de la mitosis, profase I de la meiosis, anafase I de la meiosis, profase II de la meiosis, anafase II de la meiosis. ¿Cuántas cromátides tiene la célula en cada una de estas etapas? ¿Cuánto DNA (en términos de números de C) tiene la célula en cada una de estas etapas?
12. Trazar una gráfica de la cantidad de DNA en el núcleo de una espermatogonia desde la etapa G_1 antes de la primera división meiótica hasta que la meiosis se completa. Marcar en la gráfica cada una de las etapas principales del ciclo celular y de la meiosis.
13. ¿Cuántos centriolos tiene una célula en la metafase de la mitosis?
14. Supóngase que se informa que la mayoría de los casos de trisomía se debe al envejecimiento del huevo en el oviducto mientras espera la fertilización, ¿qué tipo de evidencia podría obtenerse del examen de fetos abortados en forma espontánea que confirmaran esta sugerencia? ¿Cómo se ajustaría esto a los datos ya obtenidos?
15. Supóngase que se incuba una célula meiótica en [^{3}H]timidina entre las etapas leptoteno y cigoteno, luego se fija la célula durante el paquiteno y se prepara una autorradiografía. Se encuentra que los quiasmas son sitios con concentración de granos de plata. ¿Qué dice respecto al mecanismo de recombinación?
16. En la página 594 se explicó que dos tipos de señales participan en el paro del punto de revisión de la metafase. Considérense los resultados de un experimento reciente en el que el cinetocoro no unido de un cromosoma con una sola unión se destruyó con un rayo láser. En este estudio se encontró que, después de la destrucción del cinetocoro, la célula entró a la anafase, aunque este cromosoma no estaba bien alineado en la placa de la metafase. ¿Cómo se interpretaría este experimento en términos de las señales explicadas en el capítulo?

17. Asúmase por un momento que el cruzamiento no ocurre. ¿Habría acuerdo en que se recibió la mitad de sus cromosomas de cada uno de los padres? ¿Habría acuerdo en que se recibió un cuarto de los cromosomas de cada uno de los abuelos? ¿Cambiarían las respuestas a estas preguntas si se considerara que hubo cruzamiento?
18. En la página 573 se mencionó que las células en fase G_2 no pueden estimularse para iniciar la replicación cuando se fusionan con células en fase S. ¿Esta observación puede explicarse con base en la información presentada en la figura 13-20?
19. ¿Qué tipo de fenotipo se esperaría de una célula de levadura con fisión cuya subunidad Cdk careciera de cada uno de los residuos siguientes como resultado de una mutación: Tir 15, Tre 161?
20. En la página 584 se explicó que la duplicación del centrosoma y la síntesis de DNA se inician por efecto de la ciclina E-Cdk2, que se activa al final de G_1. Un estudio reciente encontró que la ciclina E-Cdk2 se activa en una etapa más temprana, como al principio de G_1, que la duplicación del centrosoma comienza en ese punto del ciclo celular, pero que la replicación del DNA no se inicia sino hasta la fase S. Elabórese una hipótesis para explicar por qué la síntesis de DNA no comienza también. Puede regresarse a la figura 13-20 para obtener más información.
21. ¿Qué tipo de fenotipo se esperaría de una célula cuyo polipéptido Cdc20 tiene una mutación, de tal forma que: 1) es incapaz de unirse con Mad2, o 2) es incapaz de unirse con las otras subunidades del APC, o 3) no se separó del APC al final de la anafase?
22. Los fetos cuyas células son triploides (es decir, contienen tres juegos completos de cromosomas) se desarrollan a término y mueren en la lactancia, mientras que los fetos con trisomías cromosómicas individuales suelen correr peor suerte. ¿Cómo se explica esta observación?



SITIO EN INTERNET www.wiley.com/college/karp

Las animaciones y los videos indicados en este capítulo pueden visitarse en el sitio de Cell and Molecular Biology de Karp en Internet. También hallará todas las respuestas a las preguntas analíticas recién planteadas, autoexámenes que le ayudarán a prepararse para los exámenes, y vínculos con fascinantes recursos. La sección lecturas adicionales que sigue se amplía en el sitio en Internet.

LECTURAS ADICIONALES

Acquaviva, C. & Pines, J. 2006. The anaphase-promoting complex/cyclosome: APC/C. *J. Cell Sci.* 119:2401–2404.

Barr, F. A. 2004. Golgi inheritance: shaken but not stirred. *J. Cell Biol.* 164:955–958.

Bashir, T. & Pagano, M. 2005. Cdk1: the dominant sibling of Cdk2. *Nature Cell Biol.* 7:779–781.

Delattre, M. & Gönczy, P. 2004. The arithmetic of centrosome biogenesis. *J. Cell Sci.* 117:1619–1629.

Glotzer, M. 2005. The molecular requirements for cytokinesis. *Science* 307:1735–1739.

Hirano, T. 2006. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 7:311–322.

Hunt, T. & Evans, T. 2004. The discovery of cyclin. *Cell* S116:S63–S65.

Hyams, J. S. et al. 2005. Cytokinesis: the great divide. *Trends Cell Biol.* 15:1, 10, 92, 156, 200, 277, etc. [serie de artículos sobre citocinesis.]

Kastan, M. B. & Bartek, J. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432:316–323.

Kellogg, D. R. 2003. Weel-dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division. *J. Cell Sci.* 116:4883–4890.

Khodjakov, A. & Kapoor, T. 2005. Microtubule flux: what is it good for? *Curr. Biol.* 15:R966–R968.

Margolin, W., et al. 2004. Series of reviews on the cell cycle. *Curr. Biol.* 14:R768–R818.

Marston, A. L., & Amon, A. 2004. Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 5:983–997.

McIntosh, J. R., et al. 2002. Chromosome-microtubule interactions during mitosis. *Annu. Rev. Cell Devel. Biol.* 18:193–219.

Mitchell, A., et al., eds. 2001. Milestones in Cell Division. *Nature Cell Biol.* Suppl. December.

Murray, A. W. 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116:221–234.

Nasmyth, K. 2005. How do so few control so many? *Cell* 120:739–746. [punto de revisión del huso.]

Nurse, P., Masui, Y., & Hartwell, L. 1998. Understanding the cell cycle. *Nature Med.* 4:1103–1106.

Nurse, P. 2004. Wee Beasties. *Nature* 432:557. [sobre los primeros estudios del ciclo celular en levaduras de fisión.]

O'Connell, M. J. & Cimprich, K. A. 2005. G2 damage checkpoints: what is the turn-on? *J. Cell Sci.* 118:1–6.

Peters, J.-M. 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 7:644–656.

Pines, J. 2006. Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time. *Trends Cell Biol.* 16:55–63.

Pinsky, B. A. & Biggins, S. 2005. The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends Cell Biol.* 15:486–493.

Salmon, E. D. 2005. Microtubules: a ring for the depolarization motor. *Curr. Biol.* 15:R299–R302.

Sherr, C. J. & Roberts, J. M. 2004. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Develop.* 18:2699–2711.

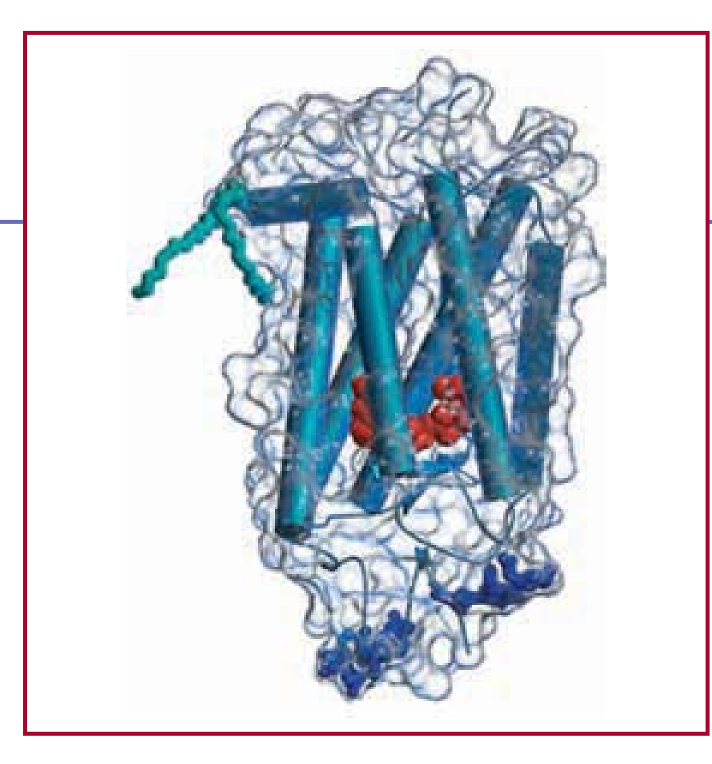
Shiloh, Y. 2006. The ATM-mediated DNA-damage response. *Trends Biochem. Sci.* 31:402–410.

Watanabe, Y. 2004. Modifying sister chromatid cohesion for meiosis. *J. Cell Sci.* 117:4017–4023.

Zickler, D. & Kleckner, N. 1998. The leptotene-zygotene transition in meiosis. *Annu. Rev. Gen.* 32:619–697.

Zickler, D. & Kleckner, N. 1999. Meiotic chromosomes: Integrating structure and function. *Annu. Rev. Gen.* 33:603–754.

CAPÍTULO 15

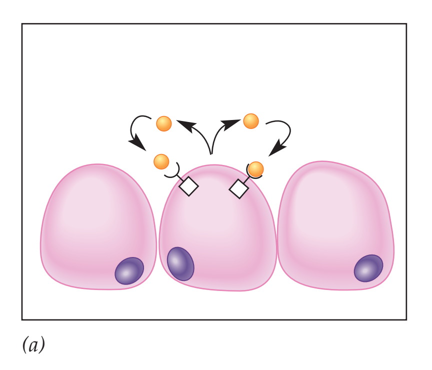


Señalización celular y transducción de señales: comunicación entre las células

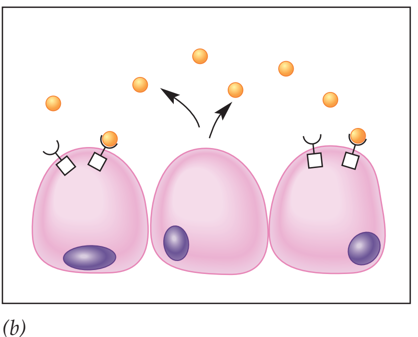
El poeta inglés John Donne expresó su creencia en la interdependencia de los seres humanos con la siguiente frase: "Ningún hombre es una isla". Lo mismo puede decirse de las células que forman un organismo multicelular complejo. La mayoría de las células de una planta o un animal se especializan en una o más funciones específicas. Muchos procesos biológicos exigen que varias células trabajen juntas y coordinen sus actividades. Para que esto sea posible, las células tienen que comunicarse entre sí, lo cual se logra mediante un proceso llamado **señalización celular**. Ésta hace posible que las células hablen entre sí y que un organismo funcione como un sistema coherente.

La señalización celular afecta todos los aspectos de la estructura y función celulares, una de las principales razones para que este capítulo se incluya casi al final del libro. Por un lado, para poder comprender una señal celular es necesario conocer otros tipos de actividad celular. Por otro lado, la descripción de la señalización celular puede reunir varios procesos celulares que parecerían independientes. La señalización celular también

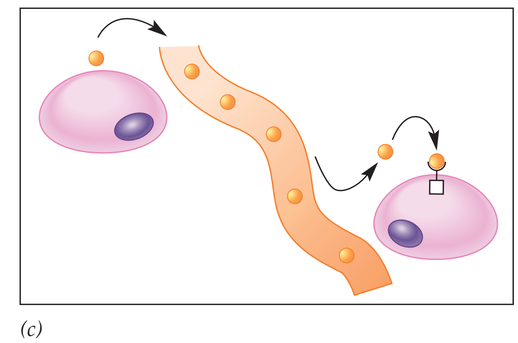
Estructura tridimensional de la rodopsina, la proteína sensible a la luz que se encuentra en los bastones de la retina. La rodopsina es miembro de una enorme familia de receptores caracterizada por siete hélices alfa que cruzan la membrana (mostrados como cilindros) que reaccionan a los estímulos extracelulares y transmiten la señal al citoplasma. La rodopsina se activa cuando su grupo retinal (mostrado en rojo) absorbe un fotón de luz, lo cual induce un cambio en la conformación de la proteína que se transmite a una proteína G en la superficie interna de la membrana. (Cortesía de Craig A. Behnke, Emerald BioStructures.)



(a)



(b)



(c)

FIGURA 15-1 **Tipos de señalización intercelular autocrina (*a*), paracrina (*b*) y endocrina (*c*).**

está muy relacionada con la regulación del crecimiento y la división celular. Esto hace que el estudio de la señalización celular sea crucial para comprender de qué manera una célula puede perder la capacidad de controlar la división celular y convertirse en un tumor maligno.

15.1 LOS ELEMENTOS BÁSICOS DE LOS SISTEMAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR

Tal vez sea útil comenzar el análisis de este tema tan complejo con la descripción de algunas de las características generales que comparten la mayoría de las vías de señalización. Por lo general, las células se comunican entre sí mediante **moléculas mensajeras extracelulares**. Los mensajeros extracelulares pueden viajar una distancia corta y estimular células en estrecha proximidad con el origen del mensaje, o viajar por todo el cuerpo y potencialmente estimular células muy alejadas de la fuente. En el caso de la señalización *autocrina*, la célula que produce el mensajero expresa receptores en su superficie los cuales pueden responder a ese mensaje (fig. 15-1*a*). En consecuencia, las células que liberan el mensaje se estimularán (o inhibirán) a sí mismas. Durante la estimulación *paracrina* (fig. 15-1*b*), las moléculas mensajeras viajan sólo cortas distancias por el espacio extracelular hasta células en estrecha proximidad con la célula que genera el mensaje. Las moléculas mensajeras paracrinas suelen estar limitadas en su capacidad de viajar por el cuerpo porque son inherentemente inestables, o son degradadas por enzimas, o se unen a la matriz extracelular. Finalmente, durante la señalización *endocrina*, las moléculas mensajeras llegan a sus células blanco a través del torrente sanguíneo (fig. 15-1*c*). Los mensajeros endocrinos también se llaman *hormonas*, y suelen actuar en células blanco localizadas en sitios distantes del cuerpo.

En la figura 15-2 se presenta un panorama general de las vías de señalización celular. La señalización celular se inicia con la liberación de una molécula mensajera por una célula que envía mensajes a otras células del cuerpo (paso 1, fig. 15-2). Las células sólo pueden responder a un mensaje extracelular si expresan **receptores** que reconozcan y se unan de modo específico a la molécula mensajera particular (paso 2). En la mayoría de los casos, la molécula mensajera (o ligando) se une con un receptor

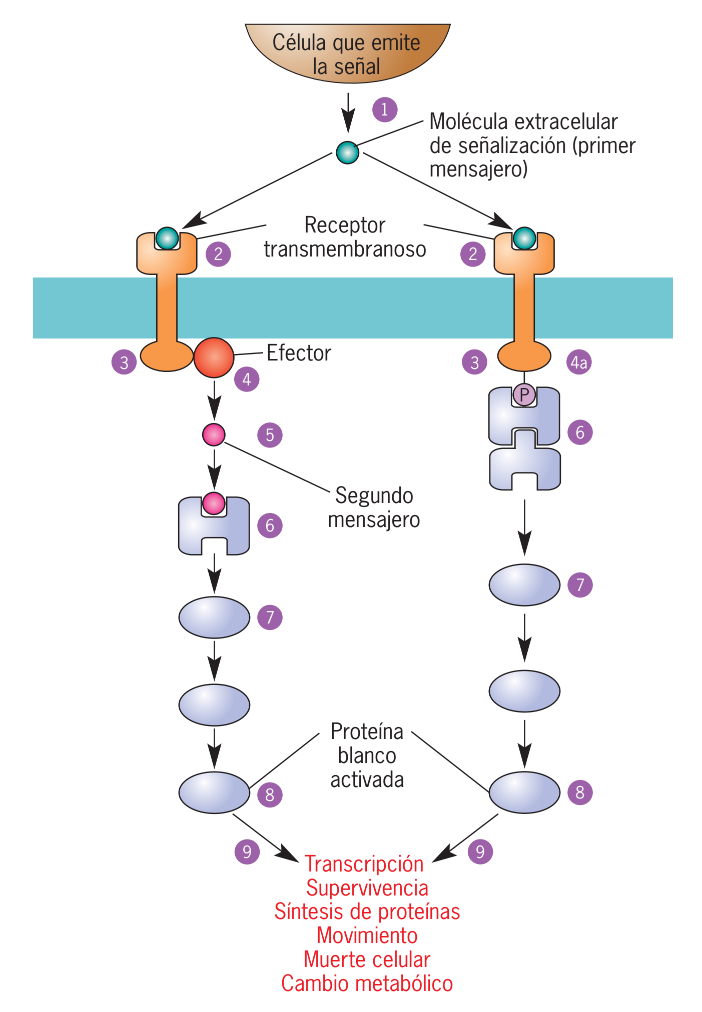


FIGURA 15-2 **Revisión de las vías de señalización por las cuales las moléculas mensajeras extracelulares pueden inducir reacciones intracelulares.** Se muestran dos tipos diferentes de vías de transducción de señal, una en la que se activa la vía de señalización mediante un segundo mensajero con capacidad de difusión y otra vía que se activa mediante el reclutamiento de proteínas a la membrana plasmática. La mayoría de las vías de transducción de señales implica una combinación de estos mecanismos. También hay que decir que las vías de señalización no siempre son trayectos lineales como los que se muestran aquí, sino que se ramifican y conectan para formar una compleja red. Los pasos se describen en el texto.

en la superficie extracelular. Esta interacción determina que una señal se releve a través de la membrana hasta el dominio citoplásmico del receptor (paso 3). Una vez que llega a la superficie interna de la membrana plasmática, la señal se transmite por dos vías principales hacia el interior de la célula. La ruta particular que tome depende del tipo de receptor que se activa.

- Un tipo de receptor (sección 15.3) transmite una señal del dominio citoplásmico a una enzima cercana (paso 4), la cual genera un **segundo mensajero** (paso 5). Como esto induce (efectúa) una reacción celular mediante la generación de un segundo mensajero, la enzima se conoce como **efector**. Los segundos mensajeros son sustancias pequeñas que casi siempre activan (o desactivan) proteínas específicas. Según sea su estructura química, un segundo mensajero puede difundirse por el citosol o permanecer incrustado en la bicapa lipídica de la membrana.
- Otro tipo de receptor (sección 15.4) transmite una señal mediante la transformación de su dominio citoplásmico en una estación de reclutamiento para las proteínas de señalización celular (paso 4a).

Ya sea que la señal se transmita por un segundo mensajero o por el reclutamiento de proteínas, el resultado es similar: se activa una proteína que se coloca en la parte superior de una **vía de señalización** (paso 6, fig. 15-2). Las vías de señalización son las superautopistas de información de la célula. Cada vía de señalización consiste en una serie de proteínas distintas que operan en secuencia (paso 7). Cada proteína de la vía casi siempre actúa mediante un cambio en la conformación de la proteína siguiente (o corriente abajo) de la serie, un fenómeno que activa o inhibe a esa proteína (fig. 15-3). Después de leer otros temas de la biología celular, no debe resultar sorprendente que los cambios en la conformación de las proteínas de señalización se efectúen a menudo por acción de cinasas de proteína y fosfatasas de proteína que agregan o retiran, respectivamente, grupos fosfato de otras proteínas (fig. 15-3). El genoma humano codifica más de 500 cinasas de proteína diferentes y más de 100 fosfatasas de proteína distintas. Algunas de estas cinasas y fosfatasas son proteínas citoplásmicas solubles y otras son proteínas integrales de membrana. Algunas de estas enzimas tienen muchas proteínas como sustratos, mientras que otras fosforilan o desfosforilan sólo a un sustrato proteico. Muchos de los sustratos proteicos de estas enzimas también son enzimas, casi siempre otras cinasas y fosfatasas, aunque los sustratos también incluyen canales iónicos, factores de transcripción y varios tipos de proteínas reguladoras. Se cree que cuando menos 50% de las proteínas de una célula se somete a fosforilación en uno o más sitios. La fosforilación proteica puede cambiar el funcionamiento de las proteínas de varias formas. La fosforilación puede activar o desactivar una enzima, aumentar o disminuir las interacciones entre proteínas, hacer que una proteína se mueva de un compartimiento intracelular a otro o actuar como señal que inicie la degradación de proteínas.

Se han identificado muchas de las cinasas de proteína y sus proteínas blanco: el principal desafío es comprender las funciones de estas diversas modificaciones postranslacionales en las actividades de diferentes tipos celulares.

Al final, las señales transmitidas por estas vías de señalización llegan a las *proteínas blanco* (paso 8, fig. 15-2) que intervienen en procesos celulares básicos (paso 9). De acuerdo con el tipo de célula y de mensaje, la respuesta iniciada por la proteína blanco puede precipitar un cambio en la expresión génica, una alteración en la actividad de las enzimas metabólicas, una nueva configuración del citoesqueleto, un aumento o descenso de la movilidad celular, un cambio de la permeabilidad iónica, activación de la síntesis del DNA (ácido desoxirribonucleico) e incluso la muerte de la célula. Virtualmente todas las actividades que realiza la célula están reguladas por señales que se originan en la superficie celular. Este proceso general, en el que la información propagada por moléculas mensajeras extracelulares se traduce en cambios que ocurren dentro de una célula, se conoce como **transducción de señal**.

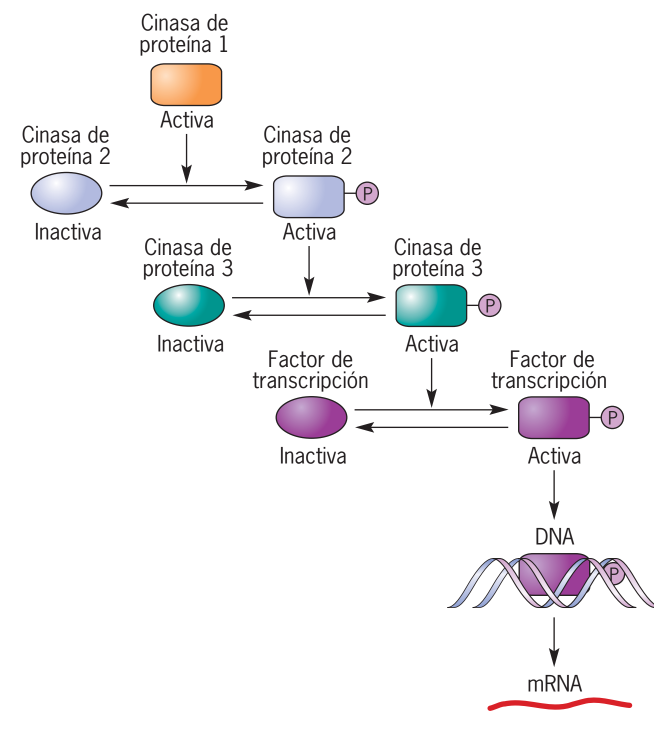


FIGURA 15-3 Vía de transducción de señal consistente en cinasa de proteína y fosfatasa de proteína cuyas acciones catalíticas cambian las conformaciones, y por tanto las actividades de las proteínas que modifican. En el ejemplo mostrado aquí, la cinasa de proteína 2 se activa por acción de la cinasa de proteína 1. Una vez activada, la enzima 2 fosforila a una tercera enzima 3, lo que activa la misma. Después, la cinasa de proteína 3 fosforila a un factor de transcripción, lo que aumenta su afinidad por un sitio en el DNA. La unión de un factor de transcripción con el DNA afecta la transcripción del gen en cuestión. Cada uno de estos pasos de activación de la vía se revierte con una fosfatasa.

Por último, la señalización debe terminarse. Esto es importante porque las células deben responder a nuevos mensajes. El primer paso consiste en eliminar la molécula mensajera extracelular. Para hacerlo, ciertas células producen enzimas extracelulares que destruyen mensajeros extracelulares específicos. En otros casos, los receptores activados se interiorizan (pág. 638). Una vez dentro de la célula, el receptor puede degradarse junto con su

ligando, lo cual atenúa la sensibilidad de la célula a los estímulos posteriores. Una alternativa es que el receptor y el ligando se separen dentro de un endosoma, después de lo cual el ligando se degrada y el receptor regresa a la superficie celular.

REVISIÓN ?

1. ¿Qué significa el término "transducción de señal"?, ¿cuáles son algunos de los pasos por los cuales puede ocurrir la transducción de la señal?
2. ¿Qué es un segundo mensajero?, ¿por qué supone que se llame así?

15.2 ESTUDIO DE LOS MENSAJEROS EXTRACELULARES Y SUS RECEPTORES

Existen muchas moléculas que pueden funcionar como portadoras extracelulares de información. Entre ellas se incluyen:

- Aminoácidos y derivados de aminoácidos. Los ejemplos incluyen glutamato, glicina, acetilcolina, adrenalina, dopamina y hormona tiroidea. Estas moléculas actúan como neurotransmisores y hormonas.
- Gases, como NO y CO.
- Los esteroides, que se derivan del colesterol. Las hormonas esteroideas regulan la diferenciación sexual, el embarazo, el metabolismo de los carbohidratos y la excreción de iones sodio y potasio.
- Eicosanoides, son moléculas no polares que contienen 20 carbonos derivados de un ácido graso llamado ácido araquidónico. Los eicosanoides regulan diversos procesos, como el dolor, la inflamación, la presión sanguínea y la coagulación de la sangre. Existen varios fármacos que están disponibles sin prescripción y son empleados para tratar cefaleas e inflamación éstos inhiben la síntesis de los eicosanoides.
- Una gran variedad de polipéptidos y proteínas. Algunos de éstos se encuentran como proteínas transmembranosas en la superficie de una célula que interactúa (pág. 259). Otros son parte de la matriz extracelular o se relacionan con ella. Por último, una gran cantidad de proteínas se excreta hacia el ambiente extracelular, donde participa en la regulación de procesos como la división celular, la diferenciación, la reacción inmunitaria o la muerte y supervivencia de las células.

Aunque no siempre, la mayoría de las veces las moléculas de señalización extracelular se reconoce por receptores específicos que se hallan en la superficie de la célula que responde. Como se ilustra en la figura 15-2, los receptores se unen con gran afinidad con sus moléculas de señalización y traducen esta interacción en la superficie externa de la célula en cambios que ocurren dentro de ella. A continuación se describen los receptores que evolucionaron para mediar la transducción de las señales.

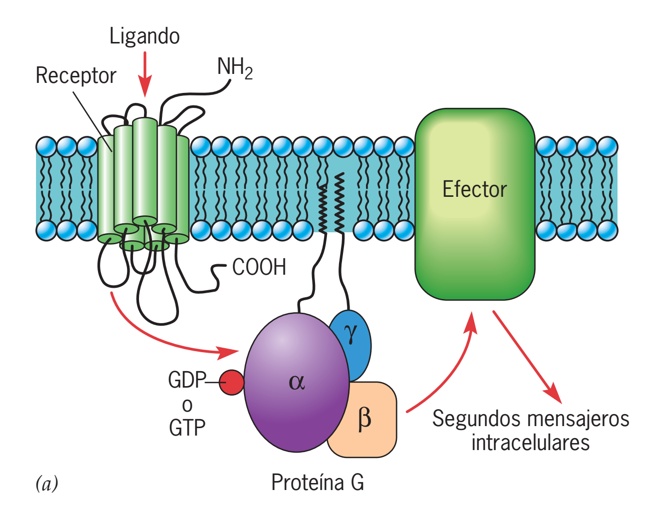
- Los receptores unidos con proteína G (GPCR) son una enorme familia de receptores que contienen siete hélices alfa transmembranosas. Éstos traducen la unión de moléculas extracelulares de señalización en la activación de proteínas de unión con GTP (trifosfato de guanosina). Las **proteínas de unión con GTP** (o **proteínas G**) se describen en relación con el desprendimiento y fusión de vesículas en el capítulo 8, la dinámica de los microtúbulos en el capítulo 9, la síntesis de proteína en los capítulos 8 y 11, y el transporte entre el núcleo y el citoplasma en el capítulo 12. En este capítulo se explora su función en la transmisión de mensajes a lo largo de "circuitos de información celular".
- Las proteintirosincinasas receptoras (RTK) representan una segunda clase de receptores que evolucionaron para traducir la presencia de moléculas mensajeras extracelulares en cambios dentro de la célula. La unión de un ligando extracelular específico con una RTK casi siempre resulta en la dimerización del receptor, seguida de la activación del dominio cinasa de proteína del receptor, el cual se vincula con su región citoplásmica. Cuando se activan, estas enzimas fosforilan sustratos proteicos citoplásmicos, lo que altera su actividad, localización o capacidad para interactuar con otras proteínas dentro de la célula. La mayoría de las cinasas de proteína transfieren grupos fosfato a residuos de serina o treonina de sus sustratos proteicos, pero como su nombre lo sugiere, las RTK fosforilan residuos de tirosina.
- Los canales activados por un ligando representan la tercera clase de receptores en la superficie celular que se unen con ligandos extracelulares. La unión con el ligando regula de manera directa la capacidad de estas proteínas para conducir un flujo de iones a través de la membrana plasmática. Un flujo iónico a través de la membrana puede precipitar un cambio temporal en el potencial de membrana, lo cual afecta la actividad de otras proteínas de membrana, por ejemplo, los canales activados por voltaje. Esta secuencia de fenómenos es la base para la formación de un impulso nervioso (pág. 165). Además, la entrada de ciertos iones, como Ca^{2+}, puede cambiar la actividad de enzimas citoplásmicas particulares. Como se explica en la sección 4.8, los canales activados por un ligando funcionan como receptores para los neurotransmisores.
- Los receptores para hormonas esteroideas funcionan como factores de transcripción regulados por un ligando. Las hormonas esteroideas se difunden a través de la membrana plasmática y se unen con sus receptores, los cuales están en el citoplasma. La unión con la hormona induce un cambio en la conformación, esto provoca que el complejo hormona-receptor se mueva hacia el núcleo y se una con elementos presentes en los promotores o intensificadores de los genes de respuesta hormonal (véase fig. 12-44). Esta interacción da origen a un aumento o descenso del ritmo de transcripción de los genes.
- Por último, hay varios tipos de receptores que actúan por mecanismos únicos. Algunos de estos receptores, como los receptores de las células B y T que participan en la reacción a los antígenos extraños, se relacionan con moléculas de señalización conocidas como cinasas citoplásmicas de proteína-tirosina. Para otros aún se desconoce el mecanismo para la transducción de la señal.

15.3 RECEPTORES UNIDOS CON PROTEÍNA G Y SUS SEGUNDOS MENSAJEROS

Los **receptores unidos con proteína G** (**GPCR**) se llaman así porque interactúan con las proteínas G, como se explica más adelante. Los miembros de la familia de GPCR también se conocen como receptores transmembranosos siete (7TM) porque contienen siete hélices transmembranosas (fig. 15-4). Se han identificado miles de distintos GPCR en organismos, desde las levaduras hasta las plantas fanerógamas y mamíferos, y en conjunto regulan un espectro extraordinario de procesos celulares. De hecho, los GPCR constituyen la superfamilia individual más grande de proteínas codificadas por genomas animales. Entre los ligandos naturales que se unen con GPCR figura un grupo diverso de hormonas, neurotransmisores, derivados del opio, quimioatrayentes (moléculas que atraen células fagocíticas del sistema inmunitario), odorantes y saborizantes (moléculas detectadas por los receptores olfatorios y gustativos que inducen los sentidos del olfato y el gusto) y fotones. El cuadro 15-1 presenta una lista de algunos de los ligandos que operan mediante esta vía y los efectores a través de los cuales actúan.

Transducción de la señal por receptores unidos con proteína G

Receptores Por lo general, los receptores unidos con proteína G tienen la siguiente topología. Su terminación amino se encuentra fuera de la célula, las siete hélices alfa que atraviesan la



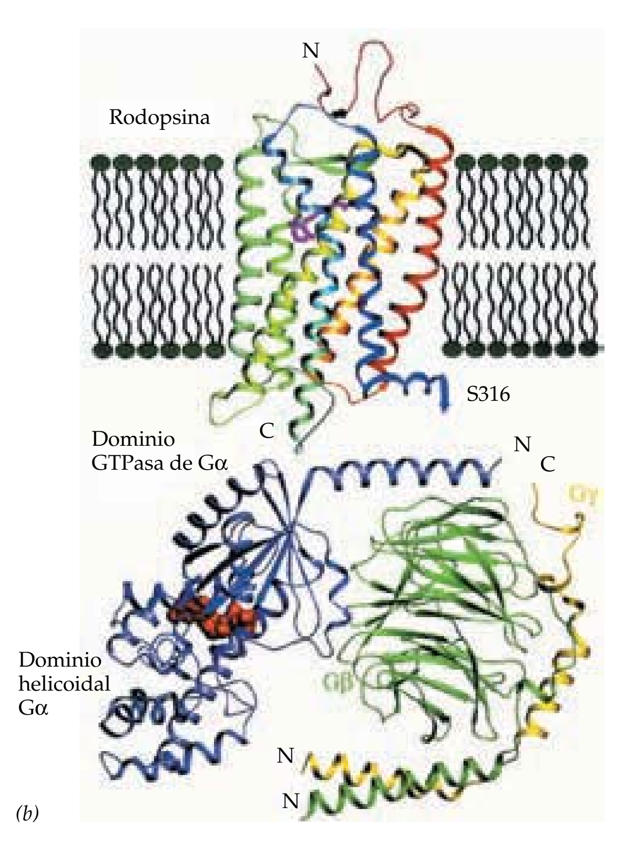


FIGURA 15-4 La maquinaria unida a la membrana para la transducción de señales mediante un receptor con siete hélices transmembranosas y una proteína G heterotrimérica. *a*) Los receptores de este tipo, incluidos los que se unen con la adrenalina y el glucagon, contienen siete hélices que cruzan la membrana. Cuando se unen con su ligando, el receptor interactúa con una proteína G trimérica, la cual activa un efector, como la adenililciclasa. Como se indica en la figura, las subunidades alfa y gamma de la proteína G están unidas con la membrana mediante grupos de lípidos que se incrustan en la bicapa lipídica. (Nota: muchos GPCR pueden activarse como complejos de dos o más moléculas receptoras.) *b*) Modelo que muestra la orientación propuesta de un GPCR (rodopsina) y una proteína G heterotrimérica (transducina) respecto de la membrana. Las tres subunidades de la proteína G tienen códigos de color. El GTP unido se muestra en rojo. La porción del extremo C de la rodopsina (después de S316) no se muestra. (*B*, TOMADA DE HEIDI E. HAMM, PROC NAT'L ACAD SCI USA 98:4819, 2001.)

Cuadro 15-1 Ejemplos de procesos fisiológicos mediados por GPCR y proteínas G heterotriméricas

Estímulo	Receptor	Efector	Respuesta fisiológica
Adrenalina	Receptor adrenérgico beta	Adenililciclasa	Degradación de glucógeno
Serotonina	Receptor para serotonina	Adenililciclasa	Sensibilización conductual y aprendizaje en *Aplysia*
Luz	Rodopsina	Fosfodiesterasa cGMP	Excitación visual
Complejo-antígeno IgE	Receptor de mastocito para IgE	Fosfolipasa C	Secreción
Péptido f-Met	Receptor quimiotáctico	Fosfolipasa C	Quimiotaxis
Acetilcolina	Receptor muscarínico	Canal del potasio	Disminución de la velocidad del marcapasos

Adaptado de L. Stryer y H. R. Bourne, reproducido con autorización de *Annual Review of Cell Biology*, vol. 2, © 1986, Annual Reviews Inc.

membrana plasmática se conectan con asas de longitud variable y la terminación carboxilo se halla en el interior de la célula (fig. 15-4). Hay tres asas presentes en el exterior de la célula y juntas forman el sitio para la unión con el ligando. También existen tres asas en el lado citoplásmico de la membrana plasmática que proporcionan sitios de unión para las proteínas G intracelulares de señalización. Las proteínas G se unen con la tercera asa intracelular. Las arrestinas, cuya función se describe en la página 622, también se unen con la tercera asa intracelular y compiten con las proteínas G para unirse con el receptor. Por último, hay una cantidad cada vez mayor de proteínas que se unen con la terminación carboxilo de los GPCR. Muchas de estas proteínas actúan como andamiajes moleculares que vinculan receptores de varias proteínas de señalización y efectores presentes en la célula.

No hay mucha información estructural que ayude a comprender cómo es que el cambio conformacional causado por la unión de una hormona o un neurotransmisor a un GPCR se transfiere a través de la membrana plasmática. El modelo alostérico sostiene que los GPCR pueden existir en una conformación activa y una inactiva. Esta última es estabilizada por interacciones no covalentes entre las hélices α transmembrana. La unión a un ligando perturba estas interacciones, lo cual hace que el receptor asuma una conformación activa. Esto requiere de rotaciones y corrimientos de las hélices α transmembrana unas respecto de otras. Dado que están unidas a las asas citoplásmicas, la rotación o el desplazamiento de estas hélices α transmembrana unas respecto a otras causan cambios en la conformación de las asas citoplásmicas. Esto a su vez ocasiona un aumento en la afinidad del receptor por una proteína G que está presente en la superficie citoplásmica de la membrana plasmática (fig. 15-4*b*). Como consecuencia, el receptor unido con el ligando forma un complejo receptor-proteína G (fig. 15-5, paso 1). La interacción con el receptor induce un cambio en la conformación de la subunidad alfa de una proteína G, con lo que se libera GDP (difosfato de guanosina) y luego se une una molécula de GTP (paso 2). Mientras permanece en estado activo, un solo receptor puede activar varias moléculas de proteína G, lo que representa un medio para la amplificación de la señal (se describe mejor en la pág. 631).

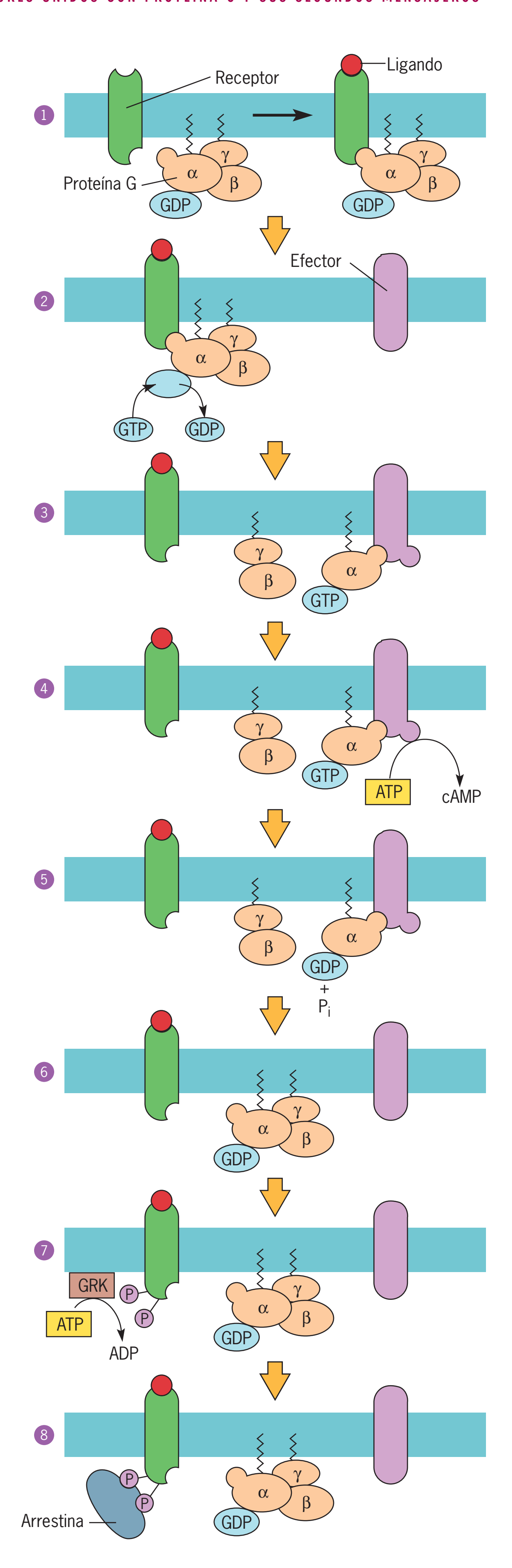


FIGURA 15-5 El mecanismo de activación (o inhibición) mediada por receptor de los efectores mediante las proteínas G heterotriméricas. En el paso 1, el ligando se une con el receptor, lo que altera su conformación y aumenta su afinidad por la proteína G con la que se une. En el paso 2, la subunidad G_α libera su GDP, que se sustituye con GTP. En el paso 3, la subunidad G_α se separa del complejo $G_{\beta\gamma}$ y se une con un efector (en este caso, adenililciclasa), lo que activa al efector. El dímero $G_{\beta\gamma}$ también puede unirse con un efector (no se muestra), como un canal iónico o una enzima. En el paso 4, la adenililciclasa activada produce cAMP. En el paso 5, la actividad de la GTPasa de G_α hidroliza al GTP unido, lo que desactiva G_α. En el paso 6, G_α se relaciona de nueva cuenta con $G_{\beta\gamma}$, con lo que se reintegra la proteína G trimérica y el efector suspende su actividad. En el paso 7, el receptor ya se fosforiló por acción de una GRK y en el paso 8 el receptor fosforilado se unió con una molécula de arrestina, lo cual inhibe al receptor unido con ligando para que no active más proteínas G. Es probable que el receptor unido con la arrestina se capte por endocitosis.

Proteínas G Las proteínas G heterotriméricas fueron descubiertas, purificadas y caracterizadas por Martin Rodbell y sus colegas en los *National Institutes of Health* y Alfred Gilman y sus colegas en la *University of Virginia*. Sus estudios se describen en la sección Vías experimentales, que pueden encontrarse en Internet en *www.wiley.com/college/karp*. Estas proteínas se conocen como proteínas G porque se unen con nucleótidos de guanina, sea GDP o GTP, como se analiza en la página 639. Se describen como heterotriméricas porque todas ellas poseen tres subunidades polipeptídicas diferentes, llamadas alfa, beta y gamma (fig. 15-4). Esta propiedad las distingue de las pequeñas proteínas monoméricas G, como Ras, que se tratan más adelante en este capítulo. Las proteínas G heterotriméricas se mantienen en la membrana plasmática mediante cadenas de lípidos que se unen en forma covalente con las subunidades alfa y gamma (fig. 15-4*a*).

El sitio para la unión con un nucleótido de guanina se encuentra en la subunidad G_α. La sustitución de GDP por GTP después de la interacción con un GPCR activado causa un cambio en la conformación en la subunidad G_α. En su conformación unida con GTP, la subunidad G_α presenta una baja afinidad por $G_{\beta\gamma}$, por lo que se disocia del complejo. Cada subunidad G_α separada (unida con GTP) está libre para activar a una proteína efectora, como la adenililciclasa (fig. 15-5, paso 3). En este caso, la activación del efector conduce a la producción del segundo mensajero AMP (monofosfato de adenosina) cíclico (paso 4). Otros efectores incluyen fosfolipasa C-beta y fosfodiesterasa de GMP cíclico (véase más adelante). A su vez, los segundos mensajeros activan una o más proteínas celulares de señalización.

Se dice que una proteína G está "encendida" o activada cuando su subunidad α está unida a GTP. Las subunidades G_α pueden desactivarse a sí mismas por hidrólisis de GTP a GDP y fosfato inorgánico (Pi) (fig. 15-5, paso 5). Esto da por resultado un cambio conformacional que causa un decremento en la afinidad por el efector y un aumento en la afinidad por la subunidad γ. Así, después de la hidrólisis del GTP, la subunidad G_α se disocia del efector y vuelve a unirse a la subunidad βγ para volver a formar la proteína G heterotrimérica inactiva (paso 6). En cierto sentido, las proteínas G heterotriméricas funcionan como temporizadores moleculares. Se encienden mediante la interacción con un receptor activado y se apagan con la hidrólisis del GTP unido después de cierto tiempo. Mientras permanecen activas, las subunidades G_α pueden encender a los efectores corriente abajo.

Las proteínas G heterotriméricas poseen cuatro formas, G_s, G_q, G_i y $G_{12/13}$. Esta clasificación se basa en las subunidades G_α y los efectores con las que se unen. Los miembros de la familia G_s se unen con receptores para la adenililciclasa. Como ya se explicó, la adenililciclasa se activa con las subunidades G_α unidas con GTP. Los miembros de la familia G_q contienen subunidades G_α que activan PLCβ. Este último hidroliza al difosfato de fosfatidilinositol, con lo que se obtiene trifosfato de inositol y diacilglicerol (pág. 627). Las subunidades G_i activadas funcionan por inhibición de la adenililciclasa. Los miembros de $G_{12/13}$ no están tan bien caracterizados como las otras familias de proteínas G, aunque su activación inapropiada se ha vinculado con proliferación celular excesiva y transformación maligna. Después de su separación de la subunidad G_α, el complejo βγ también tiene una función de señal y puede unirse por lo menos con cuatro tipos de efectores diferentes: PLCβ, canales iónicos para K^+, adenililciclasa y cinasa PI-3.

Terminación de la respuesta Ya se mostró que la unión con ligandos conduce a la activación del receptor. Los receptores activados encienden las proteínas G y éstas a su vez a los efectores. Para prevenir la estimulación excesiva, es necesario que se bloqueen los receptores para que no continúen la activación de las proteínas G. Para recuperar la sensibilidad a estímulos futuros, el receptor, la proteína G y el efector deben regresar a su estado inactivo. La *desensibilización*, proceso que bloquea a los receptores activos para que suspendan la activación adicional de las proteínas G, ocurre en dos pasos. En el primero, el dominio citoplásmico del GPCR activado se fosforila por acción de un tipo específico de cinasa, la *cinasa del receptor unido a proteína G* (*GRK*) (fig. 15-5, paso 7). Las GRK forman una pequeña familia de cinasas de proteína de serina-treonina. Los cambios en la conformación que hacen posible que los GPCR activen las proteínas G también los convierten en buenos sustratos para las GRK. Como resultado, las GRK reconocen específicamente a los GPCR activados.

La fosforilación del GPCR establece las bases para el segundo paso, que es la unión de proteínas llamadas *arrestinas* (fig. 15-5, paso 8). Las arrestinas constituyen un pequeño grupo de proteínas que se unen con los GPCR y compiten por la unión con las proteínas G heterotriméricas. Como consecuencia, la unión de la arrestina previene la activación adicional de más proteínas G. Esta acción se conoce como desensibilización porque la célula deja de responder al estímulo, mientras que ese estímulo aún actúa en la superficie externa de la célula. La desensibilización es uno de los mecanismos que permite a una célula responder a un cambio en su ambiente en lugar de continuar su "disparo" de modo indefinido en presencia de un ambiente inmutable. La importancia de la desensibilización se ilustra por la observación de que las mutaciones que interfieren con la fosforilación de la rodopsina por una GRK conducen a la muerte de las células fotorreceptoras en la retina. Se cree que este tipo de muerte celular en la retina es una de las causas de la ceguera secundaria a la retinitis pigmentosa.

Mientras permanecen unidas con los GPCR fosforilados, las moléculas de arrestina también son capaces de unirse con las moléculas de clatrina situadas en los fosos cubiertos con clatrina (pág. 311). La interacción entre la arrestina unida y la clatrina promueve la captación de GPCR fosforilados hacia el interior de la célula mediante endocitosis. Según las circunstancias, los receptores que se retiraron de la superficie por endocitosis pueden desfosforilarse y regresar a la membrana plasmática. Una alternativa es que los receptores interiorizados se degraden en los lisosomas (véase fig. 8-42). Si los receptores se degradan, las células pierden la sensibilidad para el ligando en cuestión, al menos por cierto tiempo. Si los receptores se regresan a la superficie celular, las células conservan la sensibilidad al ligando.

La señalización por la subunidad G_α activada se termina por un mecanismo menos complejo: la molécula de GTP unida tan sólo se hidroliza a GDP (paso 5, fig. 15-5). Por consiguiente, la fuerza y duración de la señal dependen en parte de la velocidad de hidrólisis del GTP por la subunidad G_α. Las subunidades G_α tienen una débil actividad de GTPasa, lo cual les permite hidrolizar lentamente el GTP unido y desactivarse a sí mismas. La terminación de la reacción se acelera por los *reguladores de la*

señalización de proteína G (*RGS*). La interacción con una proteína RGS aumenta la velocidad de hidrólisis de la GTPasa por la subunidad G_{α}. Una vez que se hidroliza la GTP, la G_{α}-GDP se vincula de nueva cuenta con las subunidades $G_{\beta\gamma}$ para reformar el complejo trimérico inactivo (paso 6) como se expuso antes. Esto devuelve el sistema a su estado de reposo.

El mecanismo para transmitir señales a través de la membrana plasmática mediante las proteínas G tiene un origen evolutivo ancestral y está muy bien conservado. Esto lo ilustra un experimento en el que células de levadura se modificaron mediante ingeniería genética, para expresar un receptor para la hormona humana somatostatina. Cuando estas células de levadura se trataron con somatostatina, los receptores de mamíferos en la superficie celular interactuaron con las proteínas G heterotriméricas de levaduras en la superficie interna de la membrana y desencadenaron una respuesta que condujo a la proliferación de las células de levadura.

Los efectos de ciertas mutaciones en la función de los receptores unidos con proteína G se explican en la sección Perspectiva humana.

PERSPECTIVA HUMANA

Trastornos relacionados con los receptores unidos con proteína G

El genoma humano puede codificar hasta 2 000 GPCR distintos. Su importancia en la biología humana se refleja por el hecho de que más de un tercio de todos los fármacos que requieren prescripción médica actúa como ligando para esta enorme superfamilia de receptores. El origen de varios trastornos hereditarios se rastreó hasta defectos en los GPCR (fig. 1) y las proteínas G heterotriméricas (cuadro 1). La retinitis pigmentosa (RP) es una enfermedad hereditaria caracterizada por degeneración progresiva de la retina, hasta llegar a ceguera. Esta anomalía puede deberse a mutaciones en el gen que codifica la rodopsina, el pigmento visual de los bastones. Muchas de estas mutaciones conducen a terminación prematura o plegamiento inadecuado de la

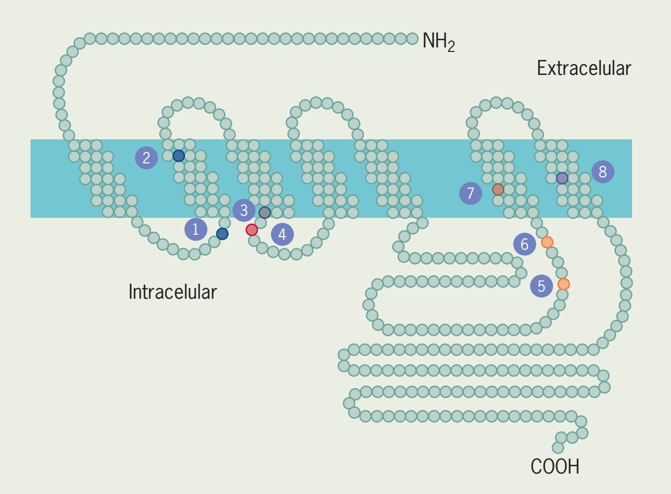


FIGURA 1 Representación bidimensional de un receptor transmembranoso "compuesto" que muestra los sitios aproximados de varias mutaciones causantes de enfermedades humanas. La mayoría de las mutaciones (núms. 1, 2, 5, 6, 7 y 8) produce estimulación constitutiva del efector, pero otras (3 y 4) bloquean la capacidad del receptor para estimular al efector. Las mutaciones en los sitios 1 y 2 se encuentran en el receptor para la MSH (hormona estimulante de los melanocitos); la 3 en el receptor para ACTH (hormona adrenocorticotrópica); la 4 en el receptor para vasopresina; 5 y 6 en el receptor para TSH (hormona estimulante de la tiroides); 7 en el receptor para LH (hormona luteinizante), y 8 en la rodopsina, el pigmento fotosensible de la retina.

Cuadro 1 Enfermedades humanas vinculadas con la vía de la proteína G

Enfermedad	Proteína G defectuosa*
Osteodistrofia hereditaria de Albright y seudohipoparatiroidismos	$G_{s\alpha}$
Síndrome de McCune-Albright	$G_{s\alpha}$
Tumores hipofisarios y tiroideos (oncogén *gsp*)	$G_{s\alpha}$
Tumores suprarrenocorticales ováricos (oncogén *gip*)	$G_{i\alpha}$
Pubertad precoz combinada y seudohipoparatiroidismo	$G_{s\alpha}$

Enfermedad	Receptor defectuoso unido con proteína G
Hipercalciemia hipocalciúrica familiar	Receptor BoPCAR1 análogo del humano
Hiperparatiroidismo neonatal grave	Receptor BoPCAR1 análogo del humano (homocigoto)
Hipertiroidismo (adenomas tiroideos)	Receptor para tirotropina
Pubertad masculina precoz familiar	Receptor para hormona luteinizante
Diabetes insípida nefrógena cruzada	Receptor V2 para vasopresina
Retinitis pigmentosa	Receptor rodopsina
Daltonismo, variaciones de la sensibilidad al espectro	Receptor de opsina de conos
Deficiencia familiar de glucocorticoides y deficiencia adrenocorticotrópica	Receptor para hormona aislada de glucocorticoides (ACTH)

*Como se describe en el texto, una proteína G con una $G_{s\alpha}$ actúa para estimular al efector, mientras que una proteína G con una $G_{i\alpha}$ lo inhibe.
Fuente: D. E. Clapham, reimpreso con autorización de *Nature*, vol. 371, pág. 109, 1994. © 1994, Macmillan Magazines Ltd.

proteína rodopsina y su eliminación de la célula antes de llegar a la membrana plasmática (pág. 292). Otras mutaciones dan lugar a la síntesis de una molécula de rodopsina que no puede activar su proteína G y, por lo tanto, no puede transmitir la señal corriente abajo hacia el efector.

La retinitis pigmentosa es consecutiva a una mutación que causa pérdida de la función del receptor codificado. Muchas mutaciones que alteran la estructura de las proteínas de señalización pueden tener el efecto contrario, que produce lo que se conoce como "ganancia de función". En uno de estos casos se identificaron mutaciones que provocan un tipo de tumor tiroideo benigno llamado adenoma. A diferencia de las células tiroideas normales que secretan hormona tiroidea sólo como reacción a la estimulación de la hormona hipofisaria TSH, las células de estos adenomas tiroideos secretan grandes cantidades de hormona tiroidea sin necesitar el estímulo de la TSH (se dice que el receptor actúa *en forma constitutiva*). El receptor para TSH de estas células tiene una sustitución de aminoácido que afecta la estructura de la tercera asa intracelular de la proteína (fig. 1, mutaciones en sitio 5 o 6). Como resultado de la mutación, el receptor para TSH activa de manera constitutiva una proteína G en su superficie interna, lo que emite una señal continua por la vía que ocasiona no sólo la secreción excesiva de hormona tiroidea, sino la proliferación celular exagerada que representa el tumor. Esta conclusión se comprobó con la introducción de un gen mutante en células cultivadas, que en condiciones normales carecen de este receptor, y la demostración de que la síntesis de la proteína mutante y su incorporación en la membrana plasmática propiciaron la producción constante de AMP cíclico en las células modificadas por ingeniería genética.

La mutación que causan los adenomas tiroideos no se encuentra en la porción normal de la tiroides del paciente, sino sólo en el tejido tumoral, lo que indica que la mutación no se heredó sino que surgió en una de las células de la tiroides que luego proliferó hasta dar lugar al tumor. Una mutación en una célula del cuerpo, como una célula tiroidea, se llama *mutación somática*, para distinguirla de una mutación heredada que estaría en todas las células del individuo. Como resulta evidente en el capítulo siguiente, las mutaciones somáticas son un factor etiológico principal del cáncer en los seres humanos. Ya se demostró que por lo menos, un virus causante de cáncer codifica una proteína que actúa como un GPCR con actividad constitutiva. El agente es un tipo de virus del herpes que provoca sarcoma de Kaposi, en el que se reconocen lesiones cutáneas purpúreas, algo frecuente en los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida. El genoma del virus codifica un receptor con actividad constitutiva para la interleucina 8, que estimula las vías de señalización que controlan la proliferación celular.

Como se muestra en el cuadro 1, las mutaciones en los genes que codifican a las subunidades de las proteínas G heterotriméricas también pueden ocasionar trastornos hereditarios. Esto lo ilustra un informe sobre dos pacientes masculinos que sufren una rara combinación de trastornos endocrinos: pubertad precoz e hipoparatiroidismo. Se encontró que ambos pacientes tenían sustitución de un solo aminoácido en una de las isoformas de G_α. La alteración de la secuencia de aminoácidos tuvo dos efectos en la proteína G mutante. Con temperaturas inferiores a la corporal normal, la proteína G mutante se mantenía en estado activo, incluso en ausencia de un ligando unido. En cambio, con temperatura corporal normal, la proteína G mutante se mantenía inactiva, sea en presencia o ausencia del ligando. Los testículos, que se hallan lejos del centro del cuerpo, tienen temperatura menor que las vísceras (33 contra 37°C). En condiciones normales, las células endocrinas de los testículos comienzan la producción de testosterona en la pubertad como respuesta a la hormona hipofisaria LH, que empieza a producirse en esa etapa. La LH circulante se une con los receptores específicos para ella en la superficie de las células testiculares, lo que induce la síntesis de cAMP y la producción posterior de la hormona sexual masculina. Las células testiculares de los individuos con la mutación en la proteína G se estimularon para sintetizar cAMP en ausencia del ligando LH, lo que suscitó la síntesis prematura de testosterona y la pubertad precoz. En cambio, la mutación en esa misma subunidad de G_α en las células de las glándulas paratiroideas, que funcionan a una temperatura de 37°C, hizo que la proteína G permaneciera inactiva. En consecuencia, las células de las glándulas paratiroides no pueden responder a los estímulos que las inducirían a producir hormona paratiroidea en condiciones normales, lo que origina el hipoparatiroidismo. El hecho de que la mayoría de los órganos del cuerpo funcionaran de manera normal en estos sujetos indica que esta isoforma particular de G_α no es esencial en las actividades de la mayoría de las demás células.

Las mutaciones se consideran cambios raros y discapacitantes en la secuencia de nucleótidos de un gen. Por el contrario, los polimorfismos genéticos son variaciones frecuentes y "normales" en la población (pág. 418). Aun así, en los últimos años resultó claro que el polimorfismo genético puede tener un efecto considerable en las enfermedades humanas, al tornar a ciertos individuos más o menos susceptibles a determinados trastornos respecto de otros. Esto ya se documentó en el caso de los GPCR. Por ejemplo, ciertos alelos del gen que codifica al receptor adrenérgico β_2 se relacionan con una mayor probabilidad de sufrir asma o elevación de la presión sanguínea; ciertos alelos de un receptor para dopamina se relacionan con un mayor riesgo de abuso de sustancias o esquizofrenia, y algunos alelos de un gen (*CCR5*) se acompañan de una mayor supervivencia en las personas infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Como se explica en la página 420, la identificación de las relaciones entre la susceptibilidad a la enfermedad y los polimorfismos genéticos es un tema de la investigación clínica actual.

Toxinas bacterianas Como las proteínas G son tan importantes para la fisiología normal de los organismos multicelulares, representan blancos excelentes para los patógenos bacterianos. Por ejemplo, la toxina del cólera (producida por la bacteria *Vibrio cholerae*) ejerce su efecto mediante la modificación de las subunidades G_α e inhibición de su actividad de GTPasa en las células del epitelio intestinal. Como resultado, las moléculas de adenililciclasa permanecen en el modo activado, lo que agita al cAMP, que hace que las células epiteliales secreten grandes cantidades de líquido hacia la luz intestinal. La pérdida de agua consecuente con esta respuesta inapropiada conduce a menudo a la muerte por deshidratación.

La toxina de la tos ferina es uno de los diversos factores de virulencia producidos por *Bordetella pertussis*, un microorganismo que causa la tos ferina. Esta enfermedad es una infección debilitante de las vías respiratorias que se presenta en 50 millones de personas en todo el mundo cada año y causa la muerte de cerca de 350 000 de estos casos en ese mismo lapso. La toxina tosferínica también desactiva subunidades de G_α, lo que interfiere con la vía de señalización que lleva al hospedador a establecer una respuesta defensiva contra la infección bacteriana.

Segundos mensajeros

Descubrimiento del AMP cíclico, prototipo de segundo mensajero ¿De qué forma la unión de una hormona con la membrana plasmática cambia la actividad de las enzimas citoplásmicas, como la fosforilasa de glucógeno, una enzima parti-

cipante en el metabolismo del glucógeno? La respuesta a esta pregunta se obtuvo tras los estudios que comenzaron a mediados del decenio de 1950 en los laboratorios de Earl Sutherland y sus colegas de la *Case Western Reserve University,* y de Edwin Krebs y Edmond Fischer de la *Washington University*. El objetivo de Sutherland era desarrollar un sistema in vitro para estudiar las reacciones fisiológicas a las hormonas. Después de un considerable esfuerzo, pudo activar la fosforilasa de glucógeno en una preparación de células *rotas* que se habían incubado con glucagon o adrenalina. Esta preparación de células rotas pudo dividirse por centrifugación, en una fracción de partículas consistente sobre todo en membranas celulares, y una fracción de sobrenadante soluble. Aunque había fosforilasa de glucógeno sólo en la fracción sobrenadante, el material en partículas era necesario para obtener la respuesta hormonal. Los experimentos posteriores indicaron que la respuesta ocurrió por lo menos en dos pasos. Si la fracción de partículas de un homogeneizado de hígado se aislaba e incubaba con la hormona, se liberaba cierta sustancia que, cuando se agregaba a la fracción sobrenadante, activaba las moléculas solubles de fosforilasa de glucógeno. Sutherland identificó la sustancia liberada por las membranas de la fracción de partículas como monofosfato de adenosina cíclico (*AMP cíclico* o *cAMP*). Como se explica más adelante, el cAMP estimula la movilización de glucosa mediante la activación de una cinasa de proteína que agrega un grupo fosfato a un residuo específico de serina del polipéptido fosforilasa de glucógeno.

El cAMP es un **segundo mensajero** capaz de difundirse a otros sitios dentro de la célula. La síntesis de AMP cíclico sigue a la unión del primer mensajero, una hormona u otro ligando, con un receptor en la superficie externa de la célula. La figura 15-6 muestra la difusión del AMP cíclico dentro del citoplasma de una neurona después de la estimulación con una molécula mensajera extracelular. Mientras que el primer mensajero se une sólo con una sola especie de receptor, el segundo mensajero estimula con frecuencia diversas actividades celulares. Como resultado, los segundos mensajeros permiten a las células establecer una respuesta coordinada a mayor escala después de la estimulación con un solo ligando extracelular. Existen otros segundos mensajeros como el Ca^{2+}, fosfoinosítidos, trifosfato de inositol, diacilglicerol, GMP cíclico y óxido nítrico.

Segundos mensajeros derivados de fosfatidilinositol

Hasta no hace mucho tiempo, los fosfolípidos de la membrana celular se consideraban sólo como moléculas estructurales que mantenían la cohesión de las membranas y las hacían impermeables a los solutos acuosos. La apreciación de los fosfolípidos ha crecido con el descubrimiento de que estas moléculas constituyen los precursores de varios segundos mensajeros. Los fosfolípidos de las membranas celulares se convierten en segundos mensajeros por la acción de varias enzimas que se regulan como respuesta a las señales extracelulares. Estas enzimas incluyen fosfolipasas (enzimas separadoras de lípidos), fosfolipidocinasas (enzimas que fosforilan lípidos) y fosfatasas de fosfolípidos (enzimas que desfosforilan lípidos). Las fosfolipasas son enzimas que hidrolizan enlaces éster específicos que conectan diferentes bloques de construcción que forman una molécula de fosfolípido. La figura 15-7*a* muestra los sitios de separación dentro de un fosfolípido general que son el sitio de acción de las principales clases de fosfolipasas. Las cuatro clases de enzimas mostradas en la figura 15-7*a* se activan como respuesta a señales extracelulares y los productos que se obtienen funcionan como segundos mensajeros. Esta sección se enfoca en los lípidos que actúan como segundos mensajeros y han sido los mejor estudiados, los cuales se derivan del fosfatidilinositol y se producen después de la transmisión de señales de receptores unidos con proteína G y proteintirosincinasas receptoras. No se describe otro grupo de segundos mensajeros lipídicos derivados de la esfingomielina.

Fosforilación del fosfatidilinositol Cuando el neurotransmisor acetilcolina se une a la superficie de una célula muscular lisa dentro de la pared del estómago, se estimula para contraerse.

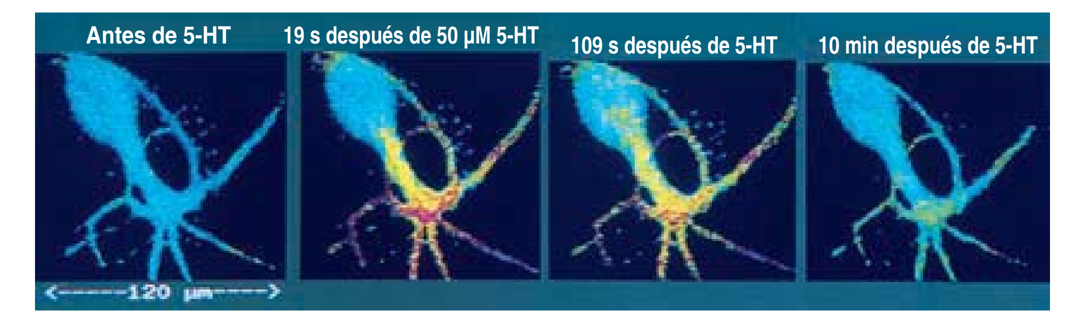


FIGURA 15-6 Formación de cAMP en una célula viva como respuesta a la adición de una molécula mensajera extracelular. Esta serie de fotografías muestra una célula nerviosa sensitiva de la liebre marina *Aplysia*. La concentración de cAMP libre está indicada por el color: el azul representa una concentración baja de cAMP, el amarillo una intermedia y el rojo una elevada. La imagen izquierda muestra el nivel intracelular del cAMP en la neurona no estimulada; las siguientes tres imágenes representan los efectos de la estimulación con el neurotransmisor serotonina (5-hidroxitriptamina) en los tiempos indicados. Nótese que los niveles de cAMP caen alrededor de los 109 s a pesar de la presencia constante del neurotransmisor. (En este experimento, el nivel de cAMP se determinó de manera indirecta con la microinyección de una cinasa de proteína dependiente de cAMP con marca fluorescente, con fluoresceína y rodamina en subunidades distintas. La transferencia de energía entre las subunidades (véase fig. 18-8) proporciona una medida de la concentración de cAMP.) (Reimpresa con autorización de Brian J. Backsai, et al., Science 260:223, 1993; © 1993, American Association for the Advancement of Science.)

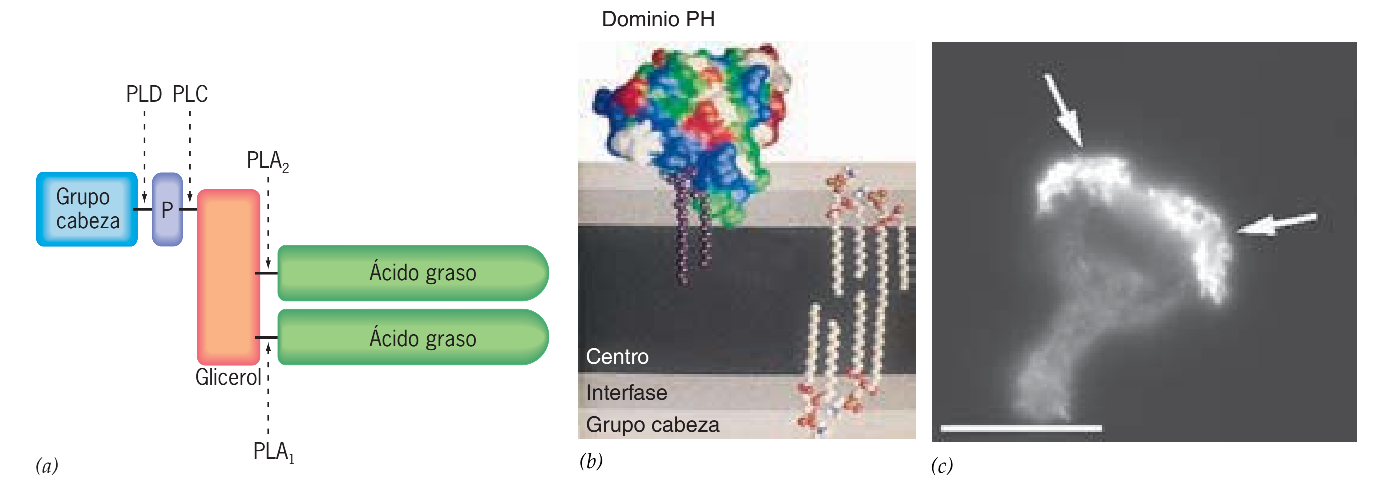


FIGURA 15-7 Segundos mensajeros con base de fosfolípido. *a*) Estructura de un fosfolípido generalizado (véase fig. 2-22). Los fosfolípidos están sometidos al ataque de cuatro tipos de fosfolipasas que dividen la molécula en los sitios indicados. De estas enzimas, la descripción se enfoca en la PLC, que divide el grupo cabeza fosforilado del diacilglicerol (véase fig. 15-8). *b*) Modelo que muestra la interacción entre una porción de una molécula de enzima PLC que contiene un dominio PH que se une con el anillo de inositol fosforilado de un fosfoinosítido. Esta interacción sujeta a la enzima con la superficie interna de la membrana plasmática y puede alterar su actividad enzimática. *c*) Micrografía con fluorescencia de una célula que se estimuló para moverse hacia un quimioatrayente (una sustancia que atrae a la célula). Esta célula se tiñó con un anticuerpo que se une de manera específica con el 3,4,5-trifosfato de PI (PIP_3), el cual se observa en el margen principal de la célula migratoria (flechas). La barra representa 15 μm. (*B*, TOMADA DE JAMES H. HURLEY Y JAY A. GROBLER, CURR OPIN STRUCT BIOL 7:559, 1997; *C*, TOMADA DE PAULA RICKERT ET AL., POR CORTESÍA DE HENRY R. BOURNE, TRENDS CELL BIOL 10:470, 2000.)

Cuando un antígeno extraño se une con la superficie de un mastocito, la estimula para secretar histamina, una sustancia que puede provocar los síntomas de un ataque de alergia. Estas dos respuestas, una que causa la contracción y la otra que induce la secreción, se activan con el mismo segundo mensajero, una sustancia derivada del compuesto fosfatidilinositol, un componente menor de la mayoría de las membranas celulares (véase fig. 4-22).

La primera indicación de que los fosfolípidos podían participar en las reacciones celulares a las señales extracelulares surgió de los estudios que realizaron a principios del decenio de 1950 Lowell y Mabel Hokin en el *Montreal General Hospital* y la *McGill University*. Estos investigadores se habían enfocado en el estudio de los efectos de la acetilcolina en la síntesis de RNA (ácido ribonucleico) en el páncreas. Para llevar a cabo estos estudios incubaron rebanadas de páncreas de paloma con [^{32}P]ortofosfato. La finalidad era que el [^{32}P]ortofosfato se incorporara en los trifosfatos de nucleósidos, que se emplean como precursores durante la síntesis del RNA. Lo interesante es que encontraron que el tratamiento del tejido con acetilcolina conducía a la incorporación de radiactividad en la fracción de fosfolípidos de la célula. El análisis adicional reveló que el isótopo se incorporaba sobre todo en el fosfatidilinositol (PI), que pronto se convertía en otros derivados fosforilados, conocidos en conjunto como **fosfoinosítidos**. Esto sugirió que los lípidos que contienen inositol pueden fosforilarse por acción de cinasas específicas que se activan como respuesta a moléculas mensajeras extracelulares, como la acetilcolina. Ahora ya se sabe que las cinasas de lípidos se activan como respuesta a una gran variedad de señales extracelulares.

Varias de las reacciones del metabolismo del fosfoinosítido se muestran en la figura 15-8. Como se indica en la parte izquierda de esta figura, el anillo inositol, que se encuentra en la superficie citoplásmica de la bicapa, tiene seis átomos de carbono. El carbono número 1 participa en el enlace entre el inositol y el diacilglicerol. Los carbonos 3, 4 o 5 pueden ser fosforilados por cinasas de fosfoinosítido presentes en las células. Por ejemplo, la transferencia de un solo grupo fosfato a la posición 4 del azúcar inositol del PI por acción de la 4-cinasa de PI (PI4K), genera 4-fosfato de fosfatidilinositol (PIP), que puede fosforilarse por acción de la 5-cinasa de PIP (PIP5K) para formar 4,5-difosfato de PI (PIP_2; fig. 15-8, pasos 1 y 2). El PIP_2 puede fosforilarse por acción de la 3-cinasa de PI para formar 3,4,5-trifosfato de PI (PIP_3) (que se muestra en la figura 15-23*c*). La fosforilación de PIP_2 para formar PIP_3 reviste particular interés porque las enzimas PI3K implicadas en este proceso pueden ser controladas por una gran variedad de moléculas extracelulares, y la sobreactividad de PI3K se ha vinculado con diversos tipos de cáncer del ser humano. En la página 644 se expone la formación de PIP_3 durante la respuesta a insulina.

Todas estas especies de fosfolípido permanecen en la hoja citoplásmica de la membrana plasmática. Del mismo modo que hay cinasas de lípidos para agregar grupos fosfato, hay fosfatasas de lípidos para retirarlos. La actividad de estas cinasas y de las fosfatasas puede regularse de manera que los fosfoinosítidos específicos aparezcan en regiones particulares de la membrana en momentos determinados después de recibir una señal.

Los anillos fosforilados de inositol de los fosfoinosítidos forman sitios de unión para varios dominios de unión a lípido presentes en proteínas. El mejor conocido es el **dominio PH**

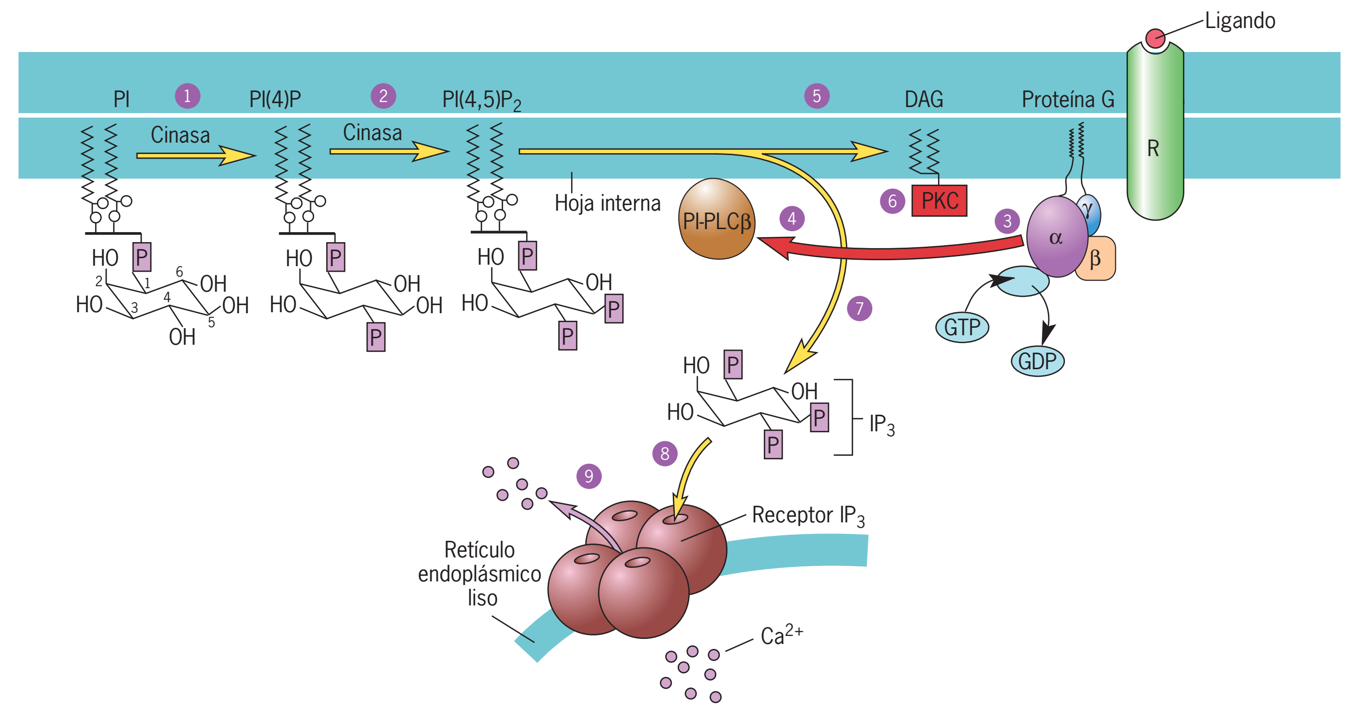


FIGURA 15-8 Generación de segundos mensajeros como resultado de la degradación inducida por ligando de los fosfoinosítidos (PI) en la bicapa lipídica. En los pasos 1 y 2 se agregan grupos fosfato mediante las cinasas de lípidos al fosfatidilinositol (PI) para formar PIP_2. Cuando el receptor capta un estímulo, el receptor unido con ligando activa una proteína G heterotrimérica (paso 3) que activa a la enzima fosfolipasa C específica para PI (paso 4), la cual cataliza la reacción en la que PIP_2 se divide en diacilglicerol (DAG) y 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) (paso 5). El DAG recluta la cinasa de proteína PKC a la membrana y activa la enzima (paso 6). El IP_3 se difunde hacia el citosol (paso 7), donde se une con un receptor IP_3 y un canal del calcio en la membrana del retículo endoplásmico liso (paso 8). La unión de IP_3 con su receptor produce la liberación de iones calcio hacia el citosol (paso 9).

(fig. 15-7*b*), que se ha identificado en más de 150 proteínas distintas. La unión de una proteína con los segundos mensajeros PIP_2 o PIP_3 congrega la proteína en la cara citoplásmica de la membrana, donde puede interactuar con otras proteínas unidas con la membrana, incluidos los activadores, inhibidores o sustratos. La figura 15-7*c* incluye un ejemplo en que el PIP_3 se localiza de manera específica en una porción particular de la membrana plasmática de una célula. Esta célula particular participa en la quimiotaxis, lo cual significa que se mueve hacia la concentración creciente de una sustancia particular en el medio que sirve como quimioatrayente. Éste es el mecanismo que hace que las células fagocíticas, como los macrófagos, se muevan hacia las bacterias u otros blancos a los que atrapan. La quimiotaxis depende de la producción localizada de mensajeros fosfoinosítidos que actúan como una brújula para informar a la célula sobre la localización del blanco (como se ilustra en la figura 15-7*c*).

Fosfolipasa C No todos los segundos mensajeros que contienen inositol permanecen en la bicapa de lípidos de una membrana, como se describió antes. Cuando la acetilcolina se une con una célula de músculo liso, o un antígeno se une con un mastocito, el receptor unido activa una proteína G heterotrimérica (fig. 15-8, paso 3), que a su vez activa al efector *fosfolipasa C-β específica para fosfatidilinositol* (PLCβ) (paso 4). Como la proteína mostrada en la figura 15-7*b*, la PLCβ se sitúa en la superficie interna de la membrana (fig. 15-8), unida ahí por la interacción entre su dominio PH y un fosfoinosítido incrustado en la bicapa. La PLCβ cataliza una reacción que separa PIP_2 en dos moléculas, *1,4,5-trifosfato de inositol* (*IP_3*) y *diacilglicerol* (*DAG*) (paso 5, fig. 15-8), dos sustancias con papeles importantes como segundos mensajeros en la señalización celular. A continuación se describe cada uno de estos segundos mensajeros.

Diacilglicerol El diacilglicerol (fig. 15-8) es una molécula lipídica que permanece en la membrana plasmática después de su formación por PLCβ. Ahí, recluta y activa a un efector, la *cinasa de proteína C* (*PKC*) (paso 6, fig. 15-8), que fosforila residuos de serina y treonina en una gran variedad de proteínas blanco.

La cinasa de proteína C tiene varias funciones importantes en el crecimiento y diferenciación celulares, el metabolismo celular y la activación de la transcripción (cuadro 15-2). La importancia aparente de la cinasa de proteína C en el control del crecimiento se demuestra en estudios con un grupo de compuestos vegetales potentes, los *ésteres de forbol*, que se parecen al diacilglicerol. Estos compuestos activan a la cinasa de proteína C en diversas células cultivadas, hacen que pierdan el control del crecimiento y se comporten como células malignas durante un tiempo. Cuando el éster de forbol se elimina del medio, las células recuperan sus propiedades de crecimiento normales. En cambio, las células que se modificaron mediante ingeniería

Cuadro 15-2 Ejemplos de las reacciones que media la cinasa de proteína C

Tejido	Reacción
Plaquetas	Liberación de serotonina
Mastocitos	Liberación de histamina
Médula suprarrenal	Secreción de adrenalina
Páncreas	Secreción de insulina
Células hipofisarias	Secreción de GH y LH
Tiroides	Secreción de calcitonina
Testículos	Síntesis de testosterona
Neuronas	Liberación de dopamina
Músculo liso	Aumento de contractilidad
Hígado	Hidrólisis de glucógeno
Tejido adiposo	Síntesis de grasa

Fuente: U. Kikkawa y Y. Nishizuka, reproducido con autorización de *Annual Review of Cell Biology*, vol. 2, © 1986, Annual Reviews Inc.

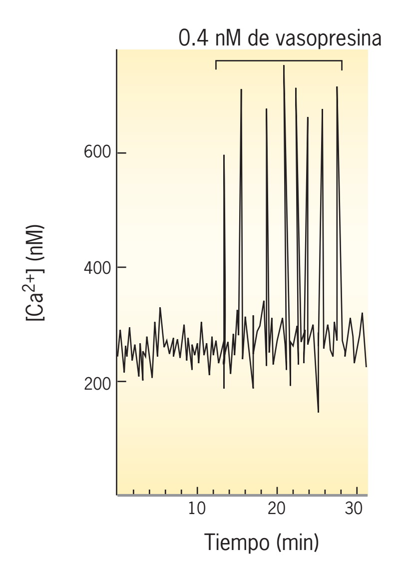


FIGURA 15-9 Demostración experimental de los cambios en la concentración de calcio libre como reacción a la estimulación hormonal. Una sola célula hepática se inyectó con acuorina, una proteína extraída de cierta medusa que produce luminiscencia cuando se une con iones de calcio. La intensidad de la luminiscencia es proporcional a la concentración de iones libres de calcio. La exposición de la célula a la vasopresina produce espigas controladas en la concentración de calcio libre a intervalos periódicos. Las concentraciones más altas de hormona no aumentan la altura (amplitud) de las espigas, sino la frecuencia. (Reimpresa con autorización de N. M. Woods, K. S. Cuthbertson y P. H. Cobbold. Nature 319:601, 1986; © 1986 Macmillan Journals Limited.)

genética para expresar de manera constitutiva la cinasa de proteína C expresan un fenotipo maligno permanente en el cultivo celular y pueden originar tumores en ratones susceptibles. Por último, la aplicación de ésteres de forbol a la piel junto con otras sustancias induce la formación de tumores cutáneos.

1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) El 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) es un fosfato de azúcar, una pequeña molécula hidrosoluble capaz de difundirse con rapidez por el interior de la célula. Las moléculas de IP_3 formadas en la membrana se difunden hacia el citosol (paso 7, fig. 15-8) y se unen con un receptor específico para IP_3 ubicado en la superficie del retículo endoplásmico liso (paso 8). En la página 284 se mencionó que el retículo endoplásmico liso es un sitio de almacenamiento de calcio en diversas células. El receptor IP_3 también funciona como canal tetramérico para el Ca^{2+}. La unión de IP_3 abre el canal y permite que los iones Ca^{2+} se difundan al citoplasma (paso 9). Los iones de calcio también pueden considerarse segundos mensajeros o mensajeros intracelulares porque se unen con varias moléculas blanco, lo que activa reacciones específicas. En los dos ejemplos antes empleados, la contracción de una célula de músculo liso y la exocitosis de gránulos secretores con histamina en un mastocito se activan por los niveles elevados de calcio. Este también es el caso para la respuesta de una célula hepática a la hormona vasopresina (la misma hormona que tiene actividad antidiurética en el riñón, página 150). La vasopresina se une con su receptor en la superficie de la célula hepática y genera una serie de pulsos de liberación de Ca^{2+} mediados por IP_3 que aparecen como oscilaciones de calcio libre en el registro que se muestra en la figura 15-9. La frecuencia e intensidad de estas oscilaciones pueden codificar la información que regula la reacción celular específica. El cuadro 15-3 presenta una lista de algunas de las respuestas mediadas por IP_3. Más explicaciones de los iones Ca^{2+} se encuentran en la sección 15.5.

Especificidad de las reacciones relacionadas con la proteína G

Es evidente que una gran diversidad de agentes, entre ellos las hormonas, neurotransmisores y estímulos sensoriales, actúan mediante los GPCR y las proteínas G heterotriméricas para transmitir información a través de la membrana plasmática, lo que desencadena muchas y diversas respuestas celulares. Esto no significa que las diferentes partes de la maquinaria de transducción de señales sean idénticas en todos los tipos celulares. El receptor para un ligando determinado puede encontrarse en

Cuadro 15-3 Resumen de las reacciones celulares inducidas con la adición de IP_3 a células permeabilizadas o intactas

Tipo celular	Reacción
Músculo liso vascular	Contracción
Músculo liso gástrico	Contracción
Músculo esquelético	Contracción
Moho deslizante	Formación de GMP cíclico, polimerización de actina
Plaquetas	Cambio de forma, agregación
Bastones de salamandra	Modulación de la reacción a la luz
Oocitos de *Xenopus*	Movilización de calcio, despolarización de membrana
Huevos de erizo de mar	Despolarización de membrana, reacción cortical
Glándula lagrimal	Aumento de la corriente de potasio

Adaptado de M. J. Berridge, reproducido con autorización de *Annual Review of Biochemistry*, vol. 56, © 1987, Annual Reviews Inc.

varias versiones distintas (isoformas). Por ejemplo, los investigadores han identificado nueve isoformas diferentes del receptor adrenérgico que se une con la adrenalina y 15 isoformas distintas del receptor para serotonina, un neurotransmisor potente que liberan las células nerviosas en algunas partes del cerebro y que regula las emociones. Las diversas isoformas pueden tener afinidad distinta por el ligando o interactuar con diferentes tipos de proteínas G. Las isoformas diversas de un receptor pueden coexistir en la misma membrana plasmática o encontrarse en membranas de tipos distintos de células blanco. Las proteínas G heterotriméricas que transmiten señales del receptor al efector también pueden existir en múltiples isoformas, al igual que muchos de los efectores. Se han reconocido cuando menos 16 subunidades diferentes de G_α, cinco subunidades G_β y 11 subunidades distintas de G_γ, junto con nueve isoformas del efector adenililciclasa. Las diferentes combinaciones de las subunidades específicas construyen proteínas G con distintas capacidades de reacción con isoformas específicas de receptores y efectores.

Como se menciona en la página 622, algunas proteínas G actúan mediante la inhibición de sus efectores. El mismo estímulo puede activar una proteína G estimulante (una con alguna subunidad $G_{\alpha s}$) en una célula y una proteína G inhibidora (una con alguna subunidad $G_{\alpha i}$) en otra diferente. Por ejemplo, cuando la adrenalina se une con un receptor adrenérgico beta en una célula de músculo cardiaco, se activa una proteína G con una subunidad $G_{\alpha s}$, lo cual estimula la producción de cAMP, lo que a su vez aumenta la velocidad y fuerza de la contracción. En cambio, cuando la adrenalina se une con un receptor adrenérgico alfa en una célula de músculo liso en el intestino, se activa una proteína G con una subunidad $G_{\alpha i}$, la cual inhibe la producción de cAMP e induce relajación del músculo. Por último, algunos receptores adrenérgicos activan proteínas G con subunidades $G_{\alpha q}$, que activan PLCβ. Está claro que el mismo mensajero extracelular puede activar varias vías en distintas células.

Regulación de los niveles de glucosa sanguínea

La glucosa pueden usarla como fuente de energía todos los tipos de células del cuerpo. La glucosa se oxida a CO_2 y H_2O por hidrólisis en el ciclo del ácido tricarboxílico, lo que brinda a las células el ATP que puede emplearse para impulsar las reacciones que requieren energía. Debido a que es un recurso tan importante, el cuerpo mantiene las concentraciones de glucosa en el torrente sanguíneo dentro de un intervalo estrecho. Como se expone en el capítulo 3, el exceso de glucosa se almacena en las células animales en forma de glucógeno, un polímero grande y ramificado que consta de monómeros de glucosa unidos por enlaces glucosídicos. La hormona glucagon es producida por las células α del páncreas en respuesta a concentraciones bajas de glucosa en la sangre. El glucagon estimula la degradación del glucógeno y libera la glucosa en el torrente sanguíneo, lo cual hace que sus valores aumenten ahí. La hormona insulina es producida por las células β del páncreas en respuesta a altas concentraciones de glucosa y estimula la captación de ésta y su almacenamiento como glucógeno. Por último, la adrenalina, también llamada epinefrina y en ocasiones hormona de "pelea o huida", se produce en las glándulas suprarrenales en situaciones de estrés. La adrenalina incrementa las concentraciones sanguíneas de glucosa (la glucemia) para proporcionar al organismo la energía extra necesaria para enfrentar la situación estresante del momento.

La insulina actúa a través de una proteintirosincinasa receptora y su transducción de señales se expone en la página 641. En cambio, tanto el glucagon como la adrenalina actúan uniéndose al CPCR. El glucagon es una proteína pequeña formada por 29 aminoácidos, mientras que la adrenalina es una molécula pequeña derivada de la tirosina. En términos de estructura, estas moléculas no tienen nada en común, aunque ambas se unen al GPCR y estimulan la degradación del glucógeno a 1-fosfato de glucosa (fig. 15-10). Además, la unión a cualquiera de estas hormonas inhibe a la enzima sintetasa de glucógeno, que cataliza la reacción contraria en la cual se agregan unidades glucosa a las moléculas de glucógeno en crecimiento. Por lo tanto, dos estímulos diferentes (glucagon y adrenalina), reconocidos por receptores distintos, inducen la misma reacción en una misma célula blanco. Los dos receptores difieren sobre todo en la estructura del saco de unión con ligando en la superficie externa de la célula, que es específica para una u otra hormona. Después de la activación de sus ligandos respectivos, ambos receptores activan el mismo tipo de proteínas G heterotriméricas que elevan los niveles de AMP cíclico.

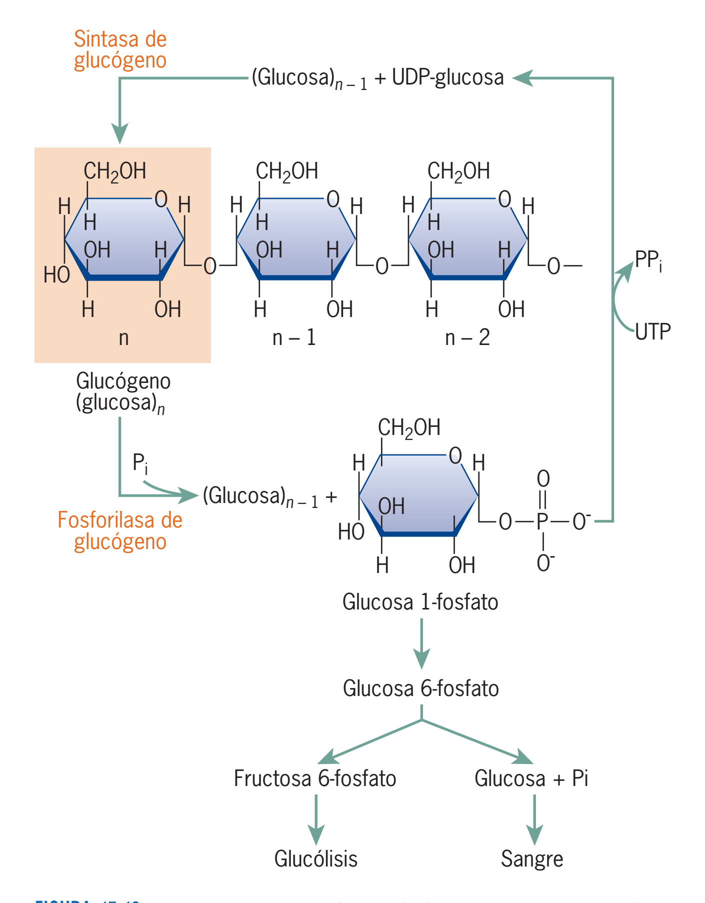


FIGURA 15-10 Reacciones que conducen al almacenamiento o movilización de glucosa. Las actividades de dos de las enzimas clave en estas reacciones, la fosforilasa de glucógeno y la sintasa de glucógeno, están bajo el control de hormonas que actúan mediante vías de transducción de señales. La fosforilasa de glucógeno se activa como respuesta al glucagon y a la adrenalina, mientras que la sintasa de glucógeno se activa como reacción a la insulina (pág. 644).

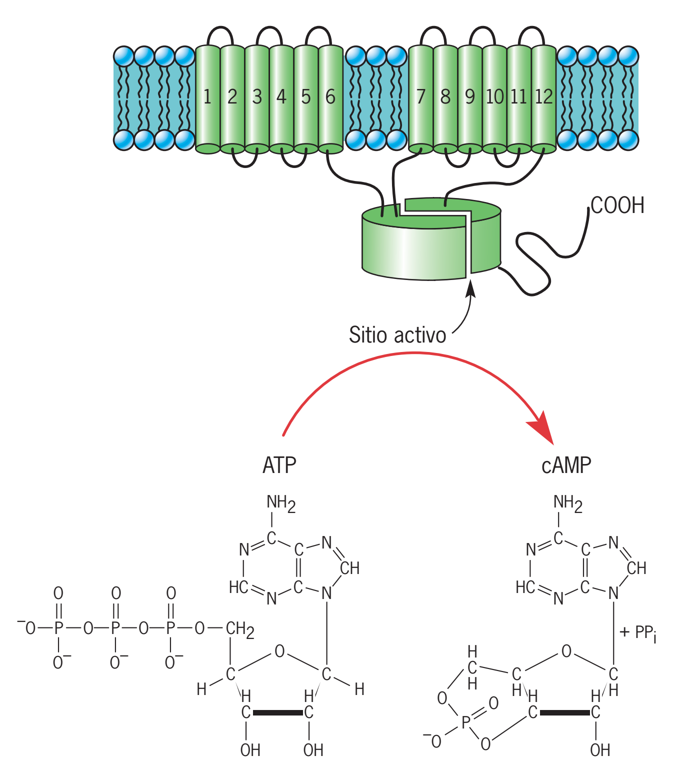


FIGURA 15-11 La formación de AMP cíclico a partir de ATP catalizado por acción de la adenililciclasa, proteína integral de la membrana que se forma con dos partes, cada una con seis hélices transmembranosas (mostradas en dos dimensiones). El sitio activo de la enzima se localiza en la superficie interna de la membrana, en una hendidura situada entre dos dominios citoplásmicos similares. La degradación del cAMP (no se muestra) se realiza mediante una fosfodiesterasa, la cual convierte al nucleótido cíclico en un 5′ monofosfato.

Movilización de glucosa: ejemplo de una reacción inducida por cAMP El cAMP se sintetiza por acción de la *adenililciclasa*, una proteína integral de la membrana cuyo dominio catalítico se encuentra en la superficie interna de la membrana plasmática (fig. 15-11). El cAMP induce una respuesta que conduce a la movilización de glucosa mediante una cadena de reacciones, como se ilustra en la figura 15-12. El primer paso en esta *cascada de reacciones* tiene lugar cuando la hormona se une con su receptor, lo que activa la subunidad $G_{\alpha s}$, la cual promueve un efector de la adenililciclasa. La enzima activada cataliza la formación de cAMP (pasos 1 y 2, fig. 15-12).

Una vez formadas, las moléculas de cAMP se difunden en el citoplasma, donde se unen con un sitio alostérico en una subunidad reguladora de una cinasa de proteína dependiente de cAMP (*cinasa de proteína A, PKA*) (paso 3, fig. 15-12). En su

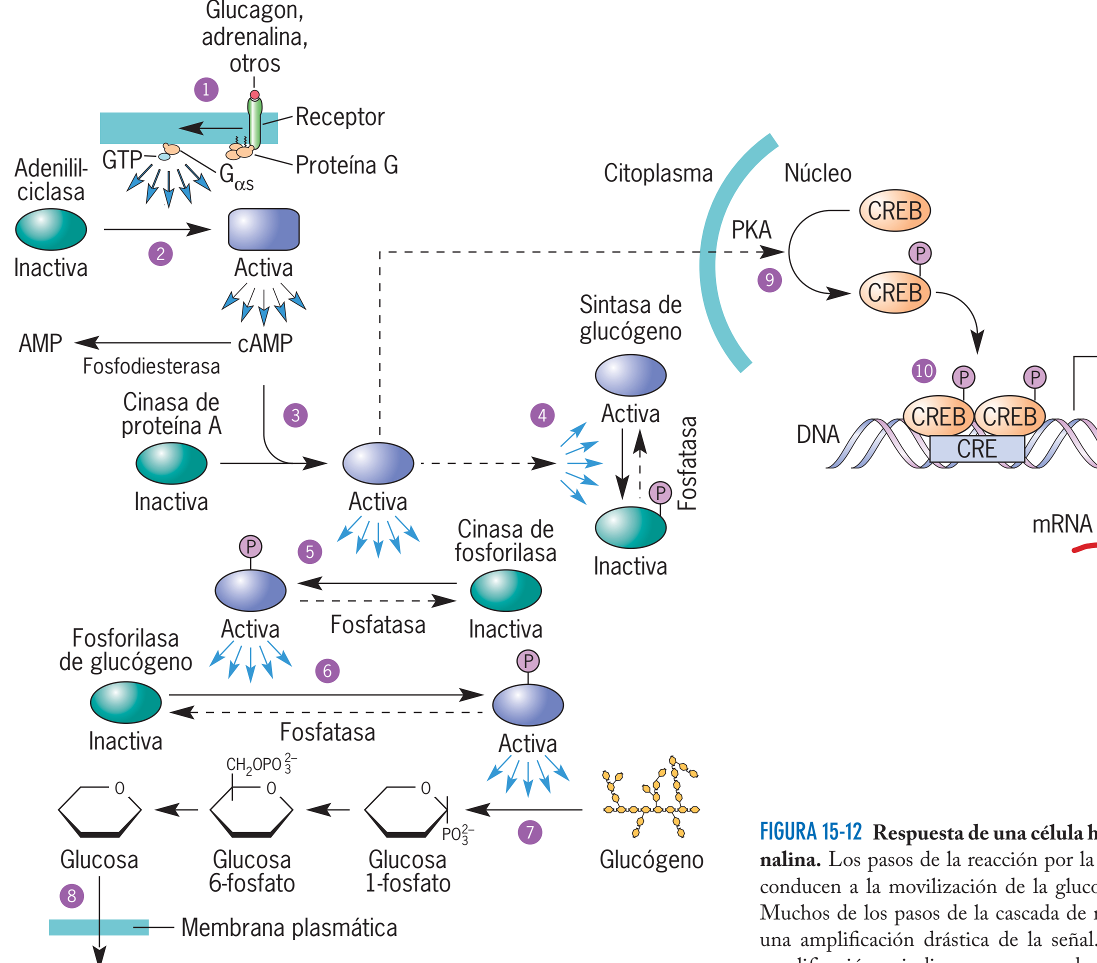


FIGURA 15-12 Respuesta de una célula hepática al glucagon o adrenalina. Los pasos de la reacción por la estimulación hormonal que conducen a la movilización de la glucosa se describen en el texto. Muchos de los pasos de la cascada de reacciones se acompañan de una amplificación drástica de la señal. Los pasos que llevan a la amplificación se indican con grupos de flechas azules.

forma inactiva, la PKA es un heterotetrámero formado por dos subunidades reguladoras (R) y dos catalíticas (C). En condiciones normales, las subunidades reguladoras inhiben la actividad catalítica de la enzima. La unión con cAMP hace que se separen las subunidades inhibidoras, con lo que se liberan las subunidades catalíticas de la PKA. Los sustratos de la PKA en una célula hepática incluyen dos enzimas que tienen un papel crucial en el metabolismo de la glucosa, la sintetasa del glucógeno y la cinasa de fosforilasa (pasos 4 y 5). La fosforilación de la sintetasa del glucógeno inhibe su actividad catalítica, con lo que se impide la conversión de glucosa en glucógeno. En cambio, la fosforilación de la cinasa de fosforilasa activa la enzima para que catalice la transferencia de grupos fosfato a las moléculas de fosforilasa de glucógeno. Como descubrieron Krebs y Fischer, la adición de un solo grupo fosfato a un residuo específico de serina en el polipéptido de la fosforilasa de glucógeno activa esta enzima (paso 6), con lo que se estimula la degradación del glucógeno (paso 7). El 1-fosfato de glucosa que se forma en la reacción se convierte en glucosa, la cual se difunde a la corriente sanguínea y así llega a los otros tejidos del cuerpo (paso 8).

Como pudiera esperarse, debe haber un mecanismo que revierta los pasos explicados antes; de lo contrario, la célula permanecería en el estado activado por tiempo indefinido. Las células hepáticas contienen fosfatasas que retiran los grupos fosfato agregados por las cinasas. Un miembro particular de esta familia de enzimas, la fosfatasa 1, puede eliminar los fosfatos de todas las enzimas fosforiladas de la figura 15-12: cinasa de fosforilasa, sintetasa del glucógeno y fosforilasa de glucógeno. La destrucción de las moléculas de cAMP presentes en la célula se logra mediante la enzima fosfodiesterasa de cAMP, la cual ayuda a terminar la respuesta.

Amplificación de señales La unión de una sola molécula de hormona con la superficie celular puede activar varias moléculas de la adenililciclasa, cada una de las cuales da origen a una gran cantidad de mensajeros cAMP en un periodo corto. Por consiguiente, la producción de un segundo mensajero representa un mecanismo para amplificar de manera considerable la señal emitida por el mensaje original. Muchos de los pasos de la cascada de reacciones ilustrada en la figura 15-12 producen la amplificación de la señal (estos pasos se indican con las flechas azules). Las moléculas de cAMP activan la PKA. Cada subunidad catalítica de PKA fosforila una gran cantidad de moléculas de cinasa de fosforilasa, las que a su vez fosforilan a una cantidad aún mayor de moléculas de fosforilasa de glucógeno, que luego pueden catalizar la formación de una cantidad mucho mayor de fosfatos de glucosa. Por lo tanto, lo que comienza como un estímulo apenas perceptible en la superficie celular pronto se transforma en una movilización mayor de glucosa dentro de la célula.

Otros aspectos de las vías de transducción de la señal del cAMP Aunque la mayoría de los efectos rápidos y mejor estudiados del cAMP se producen en el citoplasma, el núcleo y sus genes también intervienen en la respuesta. Una fracción de las moléculas de PKA activadas se traslada al núcleo, donde fosforila proteínas nucleares clave (paso 9, fig. 15-12), en particular un factor de transcripción denominado *CREB* (*proteína de unión con el elemento de respuesta a cAMP*). La versión fosforilada de CREB se une como dímero en puntos sobre el DNA (fig. 15-12, paso 10), que contiene una secuencia particular de nucleótidos (TGACGTCA), conocida como *elemento de respuesta al cAMP* (*CRE*). Debe recordarse que en la página 524 se explicó que los elementos de respuesta son sitios en el DNA en los que se unen factores de transcripción y aumentan el ritmo de iniciación de la transcripción. Los CRE se localizan en las regiones reguladoras de los genes que participan en la respuesta al cAMP. Por ejemplo, en las células hepáticas, varias de las enzimas participantes en la gluconeogénesis, una vía en la que se forma glucosa a partir de intermediarios de la glucólisis (véase fig. 3-31), se codifican en genes que contienen los CRE cercanos. Por consiguiente, la adrenalina y el glucagon no sólo activan las enzimas catabólicas participantes en la degradación del glucógeno, sino que promueven también la síntesis de enzimas anabólicas necesarias para sintetizar glucosa a partir de precursores más pequeños.

El cAMP se produce en muchas células diferentes como reacción a una gran diversidad de distintos ligandos (es decir, primeros mensajeros). El cuadro 15-4 lista varias de las respuestas hormonales mediadas por cAMP en las células de los mamíferos. Las vías del AMP cíclico también se han referido en procesos que ocurren en el sistema nervioso, como el aprendizaje, la memoria y la adicción a las drogas. Por ejemplo, el consumo crónico de opiáceos eleva los niveles de adenililciclasa y PKA, lo cual puede ser causa, al menos en parte, de las reacciones fisiológicas que se observan durante la abstinencia farmacológica. Otro nucleótido cíclico, el GMP cíclico, también actúa como

Cuadro 15-4 Ejemplos de las reacciones que inducen las hormonas mediadas por AMP cíclico

Tejido	Hormona	Reacción
Hígado	Adrenalina y glucagon	Degradación de glucógeno, síntesis de glucosa (gluconeogénesis), inhibición de la síntesis de glucógeno
Músculo esquelético	Adrenalina	Degradación de glucógeno, inhibición de la síntesis de glucógeno
Músculo cardiaco	Adrenalina	Aumento de la contractilidad
Tejido adiposo	Adrenalina, ACTH y glucagon	Catabolismo de triacilglicerol
Riñón	Vasopresina (ADH)	Aumento de la permeabilidad de células epiteliales al agua
Tiroides	TSH	Secreción de hormonas tiroideas
Hueso	Hormona paratiroidea	Aumento de la resorción de calcio
Ovario	LH	Mayor secreción de hormonas esteroideas
Corteza suprarrenal	ACTH	Incremento de la secreción de glucocorticoides

segundo mensajero en ciertas células, como lo ilustra la relajación inducida en las células de músculo liso que se explica en la página 653. El GMP cíclico tiene asimismo un papel clave en la vía de señalización de la visión.

Como el cAMP ejerce la mayoría de sus efectos mediante la activación de PKA, la reacción de una célula determinada al cAMP casi siempre depende de las proteínas específicas que se fosforilan por acción de esta cinasa (fig. 15-13). Aunque la activación de PKA en la célula hepática como respuesta a la adrenalina conduce a la degradación del glucógeno, la activación de la misma enzima en una célula del túbulo renal como reacción a la vasopresina produce una mayor permeabilidad de la membrana al agua y en una célula tiroidea como respuesta a la TSH conduce a la secreción de la hormona tiroidea. Es claro que la PKA debe fosforilar diferentes sustratos en cada uno de estos tipos celulares, con lo cual vincula el incremento de las concentraciones de cAMP inducido por adrenalina, vasopresina y TSH con diferentes respuestas fisiológicas.

Se han descrito más de 100 sustratos de PKA. La mayoría de ellos realiza funciones separadas, lo cual hace surgir la interrogante de cómo es que la PKA fosforila los sustratos apropiados en respuesta a un estímulo específico en un tipo celular específico. La respuesta se obtuvo en parte de la observación de que diferentes células expresan diferentes sustratos de PKA y en parte del descubrimiento de proteínas fijadoras de PKA o *AKAP*, que funcionan como centros de señalización. Las primeras AKAP se descubrieron como proteínas copurificadas con PKA. Desde entonces se han descubierto más de 30 AKAP, algunas de las cuales se muestran en la figura 15-14. Como se indica en esta figura, las AKAP proporcionan un marco estructural para coordinar interacciones proteína-proteína secuestrando PKA en sitios específicos de la célula. En consecuencia, la PKA se acumula en estrecha proximidad con uno o más sustratos. Cuando las concentraciones de cAMP aumentan y se activa la PKA, los sustratos necesarios están a la mano y son los primeros en ser fosforilados. Así, la selección de sustratos es en parte consecuencia de la localización de PKA en presencia de sustratos específicos. Diferentes células expresan diferentes AKAP, de lo que resulta la localización de PKA cerca de diferentes sustratos y por tal motivo la fosforilación de diferentes sustratos después de un aumento en la concentración de cAMP. Es interesante observar que, a diferencia de la mayoría de las proteínas con función similar, las AKAP tienen diversas estructuras, lo cual sugiere que la evolución dirigió distintos tipos de proteínas a realizar una actividad similar en la señalización celular.

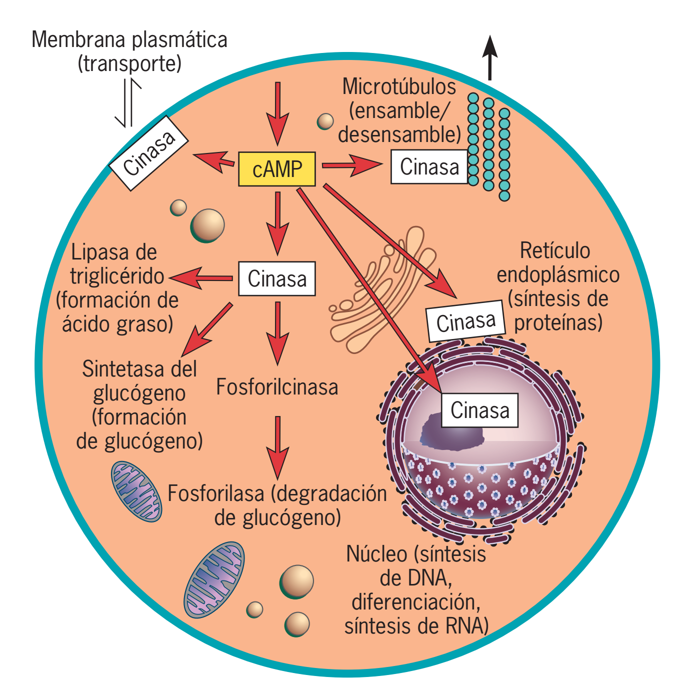


FIGURA 15-13 **Ilustración de la variedad de procesos que pueden afectarse por los cambios de la concentración de cAMP.** Se cree que todos estos efectos están mediados por la activación de la misma enzima, la cinasa de proteína A. En realidad, la misma hormona puede inducir reacciones muy diferentes en distintas células, incluso cuando se une con el mismo receptor. Por ejemplo, la adrenalina se une con un receptor similar beta adrenérgico en las células hepáticas, células adiposas y en las de músculo liso del intestino, lo que induce la producción de cAMP en los tres tipos celulares. Sin embargo, las respuestas son muy distintas: en la célula hepática se degrada glucógeno, en la célula adiposa se degradan triacilgliceroles y las células de músculo liso se relajan. Se sabe que además de la PKA, el cAMP interactúa con canales iónicos, fosfodiesterasas y GEF (pág. 639).

La función de los GPCR en la percepción sensorial

La capacidad de los seres humanos para ver, percibir sabores y olores depende en buena medida de los GPCR. Antes se mencionó que la rodopsina, cuya estructura se mostró en la página 616, es un GPCR. La rodopsina es la proteína sensible a la luz presente en los bastones de la retina, las cuales son las células fotorreceptoras que responden a la baja intensidad de luz y proporcionan las imágenes en blanco y negro del ambiente por la noche o en una habitación oscura. En los conos de la retina existen varios GPCR muy relacionados que suministran la capacidad para la visión a color cuando la luz es más intensa. La absorción de un solo fotón induce un cambio en la conformación en la molécula de rodopsina, la cual transmite la señal a una proteína G heterotrimérica (llamada *transducina*), que a su vez activa al efector unido. En este caso, el efector es la enzima fosfodiesterasa de cGMP, que hidroliza al nucleótido GMP cíclico, un segundo mensajero con estructura similar al cAMP (fig. 15-11). El cGMP tiene un cometido importante en la excitación visual en los bastones de la retina. En la oscuridad, las concentraciones de cGMP permanecen altas y por tanto este compuesto es capaz de unirse a canales de sodio accionados por cGMP en la membrana plasmática, lo cual mantiene dichos canales en una configuración abierta. La activación de fosfodiesterasa de cGMP da por resultado concentraciones más bajas de cGMP, lo que ocasiona el cierre de los canales de sodio. Esta respuesta, inusual en el sentido de que es inducida por un decremento en la concentración de un segundo mensajero, puede hacer que se generen potenciales de acción a lo largo del nervio óptico.

El sentido del olfato depende de los impulsos nerviosos transmitidos por las neuronas olfatorias desde el epitelio que recubre la parte superior de la cavidad nasal hasta el bulbo olfatorio, que se localiza en la base del cerebro. Las puntas distales de estas neuronas, que se encuentran en el epitelio nasal, con-

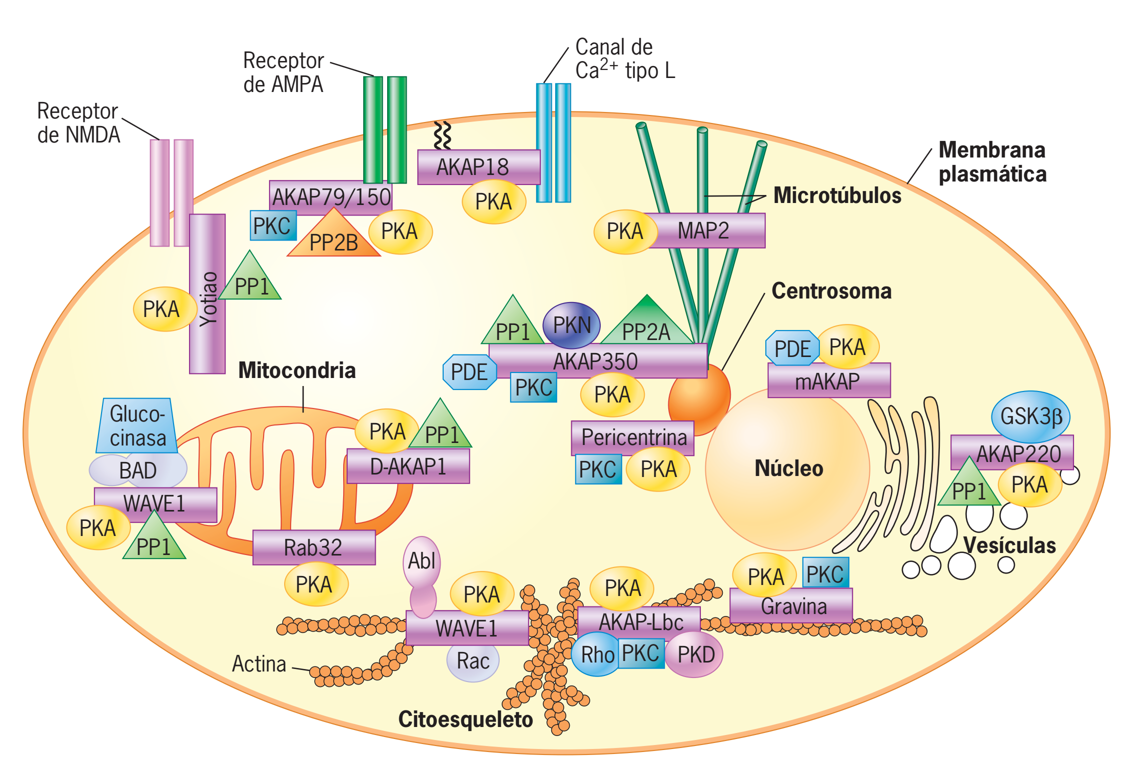


FIGURA 15-14 Representación esquemática de los complejos de señalización AKAP que operan en diferentes compartimientos celulares. La AKAP en cada uno de estos complejos proteínicos se representa por medio de la barra púrpura. En cada caso, la AKAP forma un andamiaje que reúne la molécula de AKAP con sustratos potenciales y otras proteínas implicadas en la vía de señalización. Las AKAP mostradas aquí dirigen la PKA a varios compartimientos distintos, incluidos membrana plasmática, mitocondria, citoesqueleto, centrosoma y núcleo. (Reimpresa con autorización de W. Wong and J. D. Scott, Nature Reviews Mol. Cell Biol. 5:961, 2004; © 2004, por Macmillan Journals Limited.)

tienen *receptores odoríferos*, que son GPCR capaces de unirse con varias sustancias que ingresan a la nariz. Los receptores olfatorios de los mamíferos fueron identificados por primera vez en 1991 por Linda Buck y Richard Axel de la *Columbia University*. Se estima que los seres humanos expresan apenas 400 receptores odoríferos diferentes que, en conjunto, pueden combinarse con una gran variedad de estructuras químicas distintas (odorantes).[1] Cada neurona olfatoria contiene sólo uno de los cientos de receptores odoríferos diferentes codificados en el genoma y, por consiguiente, sólo es capaz de reaccionar a una o unas cuantas sustancias relacionadas. Como resultado, la activación de distintas neuronas que contienen diversos receptores odoríferos proporciona la percepción de variados aromas. Las mutaciones en un gen específico que codifica un receptor odorífero particular pueden suscitar en una persona la incapacidad de reconocer una sustancia particular en el ambiente, que el resto de los individuos sí pueden percibir. Cuando los activan los ligandos unidos, se cree que los receptores odoríferos emiten señales a través de las proteínas G heterotriméricas a la adenililciclasa, lo que conduce a la síntesis de cAMP y la abertura de un canal catiónico activado por cAMP. Esta respuesta da lugar a la generación de potenciales de acción que se transmiten al cerebro.

La percepción de sabores tiene una discriminación mucho menor que la percepción de olores. Cada célula receptora gustativa de la lengua transmite una sensación de una de sólo cuatro cualidades básicas del sabor: salado, ácido, dulce o amargo. (Un quinto tipo de célula receptora de sabor corresponde al glutamato monosódico o al guanilato disódico, que a menudo se agrega a los alimentos procesados para intensificar el sabor.) La percepción de que un alimento o bebida son salados o ácidos proviene de manera directa de los iones sodio o los protones en el alimento. Se propone que dichos iones ingresan a los canales catiónicos en la membrana plasmática de la célula receptora del gusto, lo que conduce a la despolarización de la membrana (pág. 165). En cambio, la percepción de que el alimento es amargo o dulce depende de la interacción de un compuesto con un GPCR en la superficie de una célula receptora. Los seres humanos codifican una familia de alrededor de 25 receptores para sabor amargo llamados T2R, que se unen con la misma proteína G heterotrimérica. Como grupo, estos receptores del gusto se unen con un conjunto diverso de compuestos distintos, incluidos alcaloides vegetales o cianuros, que inducen un sabor amargo en la boca. En su mayor parte, las sustancias que suscitan esta percepción son compuestos tóxicos que inducen una respuesta protectora de disgusto que hace a la persona expulsar la sustancia de la boca. A diferencia de las células olfatorias que contienen una sola proteína receptora, una sola papila gustativa que despierta la sensación amarga contiene varios receptores T2R que responden a sustancias nocivas no relacionadas. Como resultado, se cree que muchas sustancias diversas inducen el

[1] El genoma humano contiene unos 1 000 genes que codifican receptores odoríferos, pero casi todos se hallan en la forma de seudogenes no funcionales (pág. 411). Los ratones, que dependen más que los seres humanos de su sentido del olfato, tienen más de 1 000 de estos genes en su genoma, pero 95% de ellos codifica receptores funcionales.

mismo sabor básico, lo que significa tan sólo que el alimento ingerido es amargo y desagradable. En cambio, es probable que un alimento que induce un sabor dulce contenga carbohidratos ricos en energía. Los estudios recientes sugieren que las personas poseen sólo un receptor de alta afinidad para el sabor dulce y que responde a los azúcares y los edulcorantes artificiales. Por fortuna, cuando se mastica, el alimento libera odorantes que se desplazan por la garganta hasta las células receptoras olfatorias de la mucosa nasal, lo que posibilita que el cerebro diferencie mucho más en la comida consumida que en los mensajes relativamente simples que suministran los receptores gustativos. Esta información combinada de las neuronas olfatorias y gustativas es la que proporciona el rico sentido del gusto. La importancia de las neuronas olfatorias en la percepción del gusto se torna más evidente cuando un resfriado impide reconocer parte del sabor de los alimentos.

REVISIÓN ?

1. ¿Cuál es el papel de las proteínas G en una vía de señalización?
2. Describa el experimento de Sutherland que condujo al concepto del segundo mensajero.
3. ¿Qué significa el término amplificación respecto de la transducción de señales?, ¿cómo es que el uso de una cascada de reacciones provoca amplificación de una señal?, ¿cómo incrementa esto las posibilidades de regulación metabólica?
4. ¿De qué manera el mismo primer mensajero, como la adrenalina, puede inducir diferentes reacciones en distintas células blanco y cómo el mismo segundo mensajero, como el cAMP, también es capaz de suscitar diferentes respuestas en distintas células blanco?; por último, ¿de qué forma la misma respuesta, como la degradación del glucógeno, pueden iniciarla distintos estímulos?
5. Describa los pasos que llevan de la síntesis de cAMP en la superficie interna de la membrana plasmática de una célula hepática a la liberación de glucosa hacia la corriente sanguínea. ¿Cómo controlan el proceso las GRK y la arrestina y cómo las fosfatasas de proteína y la fosfodiesterasa de cAMP?
6. Describa los pasos entre la unión de un ligando como el glucagon a un receptor con siete segmentos transmembranosos y la activación de un efector como la adenililciclasa. ¿Cómo se atenúa esta respuesta en condiciones normales?
7. ¿Cuál es el mecanismo de formación del segundo mensajero IP_3?, ¿cuál es la relación entre la formación de IP_3 y el aumento de la $[Ca^{2+}]$ intracelular?
8. Describa la relación entre el fosfatidilinositol, diacilglicerol, iones de calcio y cinasa de proteína C. ¿De qué manera los ésteres de forbol interfieren con las vías de señalización que incluyen diacilglicerol?

15.4 FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNA-TIROSINA COMO MECANISMO PARA LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL

Las proteintirosincinasas son enzimas que fosforilan residuos específicos de tirosina en sustratos proteicos. La fosforilación de proteína-tirosina es un mecanismo para la transducción de señales que apareció con la evolución de los organismos multicelulares. En el genoma humano se codifican más de 90 diferentes proteintirosincinasas. Estas cinasas participan en la regulación del crecimiento, división, diferenciación, supervivencia, unión con la matriz extracelular y migración de las células. La expresión de proteintirosincinasas mutantes que no puede regularse y se mantienen en actividad constante puede causar división celular descontrolada y cáncer. Por ejemplo, un tipo de leucemia ocurre en las células que contienen una versión no regulada de las proteintirosinasas ABL.

Las proteintirosincinasas pueden dividirse en dos grupos: **proteintirosincinasas receptoras** (**RTK**), que son proteínas integrales de membrana que contienen un dominio para unión de ligando, y las *proteintirosincinasas citoplásmicas* o no receptoras. Las RTK se activan en forma directa por factores de crecimiento y diferenciación extracelulares, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), o por reguladores metabólicos como la insulina. Las proteintirosincinasas no receptoras son reguladas en forma indirecta por señales extracelulares, y controlan procesos tan diversos como la reacción inmunitaria, la adhesión celular y la migración de células neuronales. Esta sección del capítulo se enfoca en la transducción de señales por proteintirosincinasas.

Dimerización del receptor Hay una pregunta obvia que viene a la mente cuando se considera la mecánica de la transducción de señales. ¿De qué forma la presencia de un factor de crecimiento fuera de la célula se traduce en cambios bioquímicos dentro de ella? Las investigaciones sobre la proteintirosincinasa señalan que la unión con ligando conduce a la dimerización de los dominios extracelulares para la unión con el ligando de un par de receptores. Se han reconocido dos mecanismos para la dimerización del receptor: dimerización mediada por un ligando y la dimerización mediada por un receptor (fig. 15-15). El trabajo inicial sugiere que los ligandos de las RTK contienen dos sitios para unión con el receptor. Esto hizo posible que una sola molécula de factor de crecimiento o diferenciación se una con dos receptores al mismo tiempo, lo que causa la dimerización del receptor mediada por ligando (fig. 15-15*a*). Este modelo se respaldó con la observación de que los factores de crecimiento y diferenciación, como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) o el factor estimulante de colonias 1 (CSF-1) se componen de dos subunidades similares o idénticas unidas por un disulfuro, y cada subunidad contiene un sitio para unión con el receptor. Sin embargo, no todos los factores de crecimiento parecen adaptarse a este modelo. En fechas más recientes se estableció que algunos factores de crecimiento contienen sólo un sitio para unión con receptor. Ahora, el trabajo estructural apoya un segundo mecanismo (fig. 15-15*b*) en el que la unión con el ligando induce un cambio en la conformación en el domi-

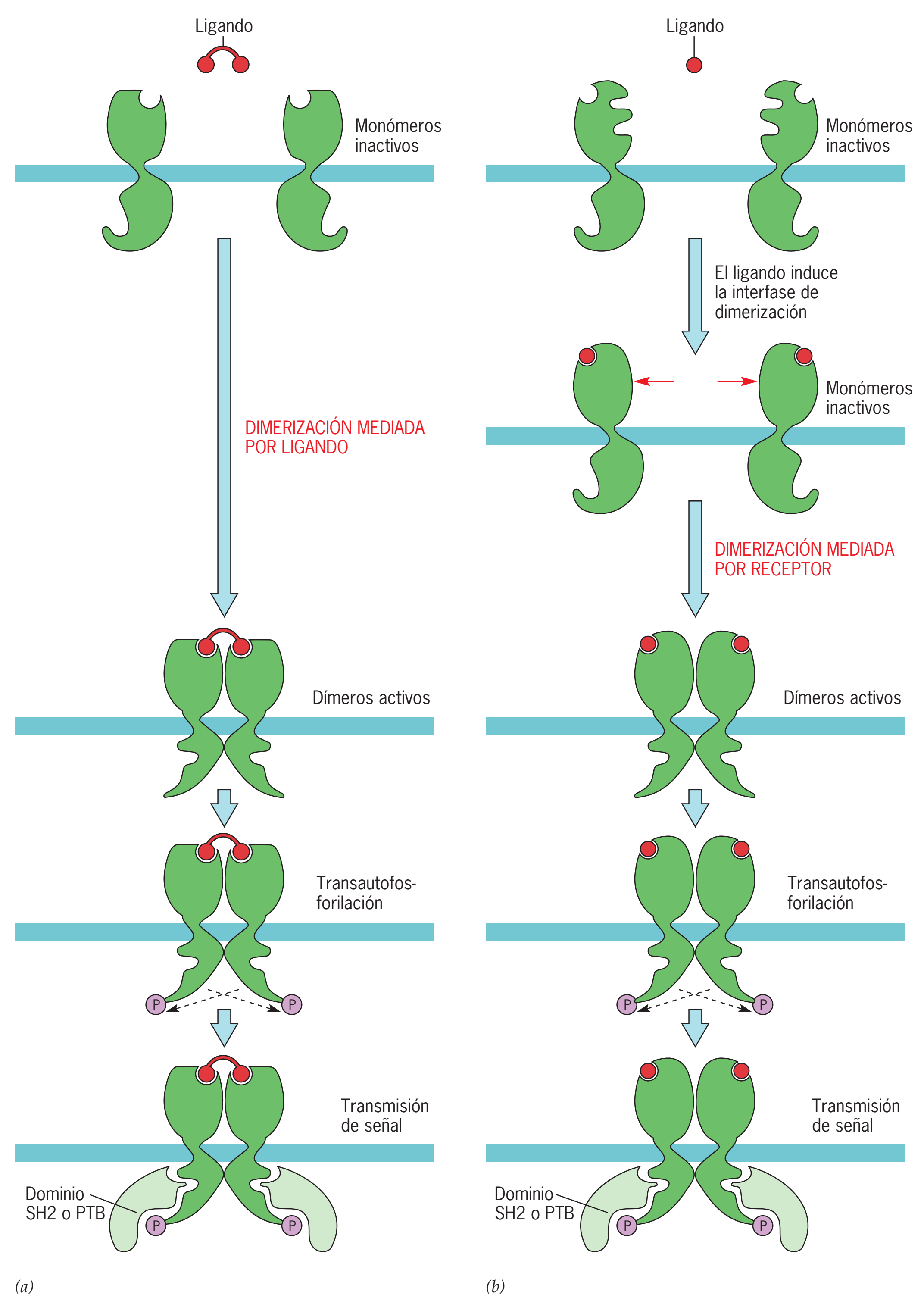


FIGURA 15-15 Pasos en la activación de una proteintirosincinasa receptora (RTK). *a*) Dimerización mediada por ligando. En el estado no activado, los receptores se encuentran en la membrana como monómeros. La unión de un ligando bivalente induce la dimerización directa del receptor y la activación de su actividad cinasa, lo que hace que agregue grupos fosfato al dominio citoplásmico de la otra subunidad receptora. Los residuos recién formados de fosfotirosina del receptor sirven como sitios de unión para las proteínas blanco que contienen dominios SH2 o PTB. Las proteínas blanco se activan como resultado de su interacción con el receptor. *b*) Dimerización mediada por el receptor. La secuencia de fenómenos es similar a la de la parte *a*, excepto porque la molécula de ligando es monovalente y, por consiguiente, una molécula de ligando se une con cada uno de los monómeros inactivos. La unión de cada ligando induce un cambio de conformación en el receptor que crea una interfase de dimerización (flechas rojas). Los monómeros unidos con el ligando interactúan mediante esta interfase para convertirse en un dímero activo. (Basada en un dibujo de J. Schlessinger y A. Ullrich, Neuron 9:384, 1992; con autorización de Cell Press.)

nio extracelular de un receptor, lo que conduce a la formación o exposición de una interfase de dimerización de receptor. Con este mecanismo, los ligandos actúan como reguladores alostéricos que activan la capacidad de sus receptores para formar dímeros. Sin importar cuál sea el mecanismo, la dimerización del receptor da lugar a la yuxtaposición de dos dominios de proteintirosincinasas en el lado citoplásmico de la membrana plasmática. Al poner en contacto estrecho dos dominios cinasa se permite la *transautofosforilación*, en la que la actividad de proteintirosincinasas de un receptor del dímero fosforila los residuos de tirosina en el dominio citoplásmico del otro receptor del dímero y viceversa (fig. 15-15*a*, *b*).

Activación de la cinasa de proteína Los sitios de autofosforilación tienen una función doble: regulan la actividad de cinasa y funcionan como sitios de unión para las moléculas de señalización citoplásmica. La actividad de cinasa casi siempre se regula mediante autofosforilación, en los residuos de tirosina presentes en el *asa de activación* del dominio de cinasa. Cuando el asa de activación no está fosforilada, se obstruye el sitio para unión con el sustrato, lo que impide la entrada de ATP. Después de su fosforilación, el asa de activación se estabiliza en una posición alejada del sitio de unión con el sustrato, lo que produce la activación del dominio cinasa. Una vez que se activa el dominio cinasa, las subunidades receptoras se fosforilan una a la otra en los residuos de tirosina presentes en las regiones adyacentes al dominio cinasa. Estos sitios de autofosforilación son los que actúan como sitios de unión para las proteínas de señalización celular.

Interacciones proteína-proteína dependientes de la fosfotirosina Las vías de señalización consisten en una cadena de proteínas de señalización que interactúan una con la otra en una secuencia (véase la fig. 15-3). Las proteínas de señalización son capaces de relacionarse con los receptores de proteintirosincinasas activados porque contienen dominios que se unen de manera específica con residuos de tirosina fosforilados (como en la figura 15-15). Hasta ahora se han identificado dos de estos dominios: el *dominio Src-homología 2* (*SH2*) y el *dominio de unión con fosfotirosina* (*PTB*). Al principio, los dominios SH2 se identificaron como parte de las proteintirosincinasas codificadas por genomas de virus causantes de tumores (oncógenos). Se integran con alrededor de 100 aminoácidos y poseen un saco de unión conservado en el que se adapta el residuo de tirosina fosforilado (fig. 15-16). En el genoma humano se codifican más de 110 dominios SH2. Éstos median una gran cantidad de interacciones proteína-proteína, que son dependientes de la fosforilación. Tales interacciones ocurren después de la fosforilación de residuos de tirosina específicos. La especificidad de las interacciones depende de la secuencia de aminoácidos adyacente inmediata a los residuos de tirosina fosforilados. Por ejemplo, el dominio SH2 de proteintirosincinasas Src reconoce pTir-Glu-Glu-Ile, mientras que los dominios SH2 de la cinasa PI 3 se unen a pTir-Met-X-Met (donde X puede ser cualquier residuo). Es interesante señalar que el genoma de las levaduras con gemación codifica solamente una proteína con dominio SH2, lo que se relaciona con la falta general de actividad de señalización proteintirosincinasas en estos eucariotas unicelulares inferiores.

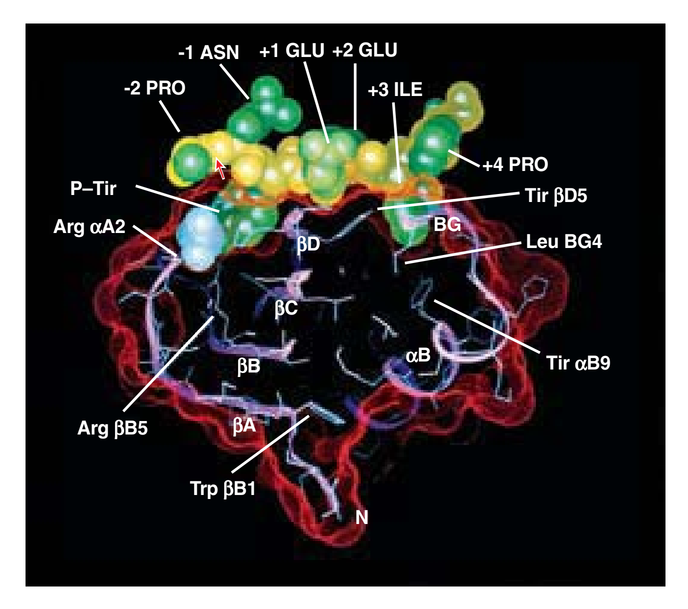
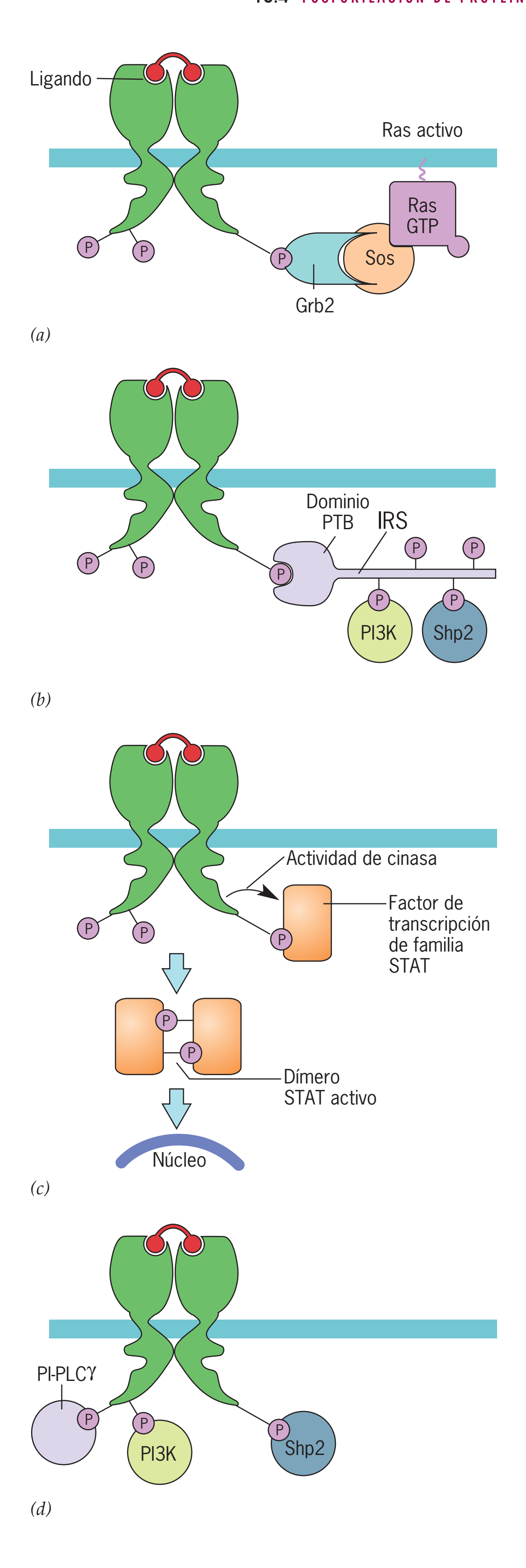


FIGURA 15-16 Interacción entre un dominio SH2 de una proteína y un péptido que contiene un residuo de fosfotirosina. El dominio SH2 de la proteína se muestra en una vista cortada con la superficie accesible representada por puntos rojos y la columna del polipéptido como un listón púrpura. El heptapéptido que contiene fosfotirosina (Pro-Asn-pTir-Glu-Glu-Ile-Pro) se muestra como un modelo que llena el espacio, cuyas cadenas laterales se colorearon de verde y la columna de amarillo. El grupo fosfato se muestra en azul claro. Se advierte que el residuo de tirosina fosforilado y el residuo de isoleucina (+3) se proyectan en sacos sobre la superficie del dominio SH2, lo que hace que estén muy ajustados, pero sólo cuando el residuo de tirosina clave se fosforila. (Tomada de Gabriel Waksman et al., por cortesía de John Kuriyan. Cell 72:783, 1993; con autorización de Cell Press.)

Los dominios PTB se descubrieron hace menos tiempo. Pueden unirse con residuos de tirosina fosforilada que casi siempre se encuentran como parte de un motivo asparagina-prolina-X-tirosina (Asn-Pro-X-Tir). Sin embargo, el asunto es más complicado porque algunos dominios PTB parecen unirse de manera específica con un motivo Asn-Pro-X-Tir no fosforilado, mientras que otros se unen de manera específica con el motivo fosforilado. Los dominios PTB no están bien conservados y distintos dominios PTB poseen diferentes residuos que interactúan con sus ligandos.

Activación de las vías de señalización corriente abajo Ya se explicó que las proteintirosincinasas receptoras (RTK) se fosforilan a sí mismas en uno o más residuos de tirosina. En el citoplasma existen diversas proteínas de señalización con dominios SH2 o PTB. Por lo tanto, la activación del receptor conduce a la formación de complejos de señalización, en los que las proteínas de señalización que contienen SH2 o PTB se unen con sitios de autofosforilación específicos presentes en el receptor (como en la figura 15-15). Se pueden distinguir varios grupos de proteínas de señalización, incluidas proteínas adaptadoras, proteínas de acoplamiento, factores de transcripción y enzimas (fig. 15-17).



- Las proteínas adaptadoras funcionan como vínculos que permiten a dos o más proteínas de señalización unirse como parte de un complejo de señalización (fig. 15-17*a)*. Las proteínas adaptadoras contienen un dominio SH2 y uno o más dominios adicionales de interacción proteína-proteína. Por ejemplo, la proteína adaptadora Grb2 muestra un dominio SH2 y dos SH3 (Src-homología 3) (fig. 15-18). Como se muestra en la página 62, los dominios SH3 se unen a motivos con secuencias ricas en prolina. Los dominios SH3 de Grb2 se unen de manera constitutiva con otras proteínas como Sos y Gab. El dominio SH2 se une con los residuos fosforilados de tirosina dentro de un motivo Tir-X-Asp. Por consiguiente, la fosforilación de tirosina del motivo Tir-X-Asp de una RTK produce la translocación de Grb2-Sos o Grb2-Gab del citosol a un receptor, el cual se encuentra en la membrana plasmática (fig. 15-17*a*).
- Las proteínas de acoplamiento, como las IRS, aportan ciertos receptores con sitios adicionales para fosforilación de tirosina (fig. 15-17*b)*. Las proteínas de acoplamiento contienen un dominio PTB o un dominio SH2 y varios sitios para fosforilación de tirosina. La unión de un ligando extracelular con un receptor conduce a la autofosforilación del receptor, lo cual proporciona un sitio para la unión del dominio PTB o SH2 de la proteína de acoplamiento. Una vez unidos, el receptor fosforila los residuos de tirosina presentes en la proteína de acoplamiento. Estos sitios de fosforilación actúan luego como sitios de unión para moléculas adicionales de señalización. Las proteínas de acoplamiento suministran versatilidad al proceso de señalización porque la capacidad del receptor para activar las moléculas de señalización puede variar con las proteínas de acoplamiento que se expresen en una célula particular.
- Los factores de transcripción se explicaron con detalle en el capítulo 12. Los factores de transcripción que pertenecen a la familia STAT tienen un importante papel en la función del sistema inmunitario (explicado en la sección 17.4). Las proteínas STAT poseen un dominio SH2 junto con un sitio

FIGURA 15-17 Diversas proteínas de señalización. Las células contienen muchas proteínas con dominios SH2 o PTB que se unen con residuos de tirosina fosforilada. *a*) Las proteínas adaptadoras, como la Grb2, funcionan como un vínculo con otras proteínas. Como se muestra aquí, Grb2 puede servir como vínculo entre un factor de crecimiento RTK activado y Sos, un activador de una proteína corriente abajo llamada Ras. La función de Ras se describe más adelante. *b*) La proteína de acoplamiento IRS contiene un dominio PTB que le permite unirse con el receptor activado. Una vez unidos, el receptor fosforila a los residuos de tirosina en la proteína de acoplamiento. Estos residuos fosforilados funcionan como sitios de unión para otras proteínas de señalización. *c*) Ciertos factores de transcripción se unen con las RTK activadas, un fenómeno que conduce a la fosforilación y activación del factor de transcripción y su traslado al núcleo. Los miembros de la familia STAT de factores de transcripción (descritos mejor en la sección 17.4) se activan de esta manera. *d*) Una gran variedad de enzimas de señalización se activa después de unirse con una RTK activada. En el caso mostrado aquí, una fosfolipasa (PLC-gamma), una lipasa (PI3K) y una proteintirosinfosfatasa (Shp2) se unieron con sitios de fosfotirosina en el receptor.

FIGURA 15-18 Estructura terciaria de una proteína adaptadora, Grb2. Ésta se forma con tres partes: dos dominios SH3 y uno SH2. Los dominios SH2 se unen con una proteína (p. ej., el receptor EGF activado) que contiene un motivo particular que incluye un residuo de fosfotirosina. Los dominios SH3 se unen con una proteína (p. ej., Sos) que posee un motivo particular rico en residuos de prolina. Se han identificado docenas de proteínas que tienen estos dominios. Las interacciones que implican dominios SH3 y SH2 se muestran en las figuras 2-40 y 15-16, respectivamente. Otras proteínas adaptadoras incluyen Nck, Shc y Crk. (Reimpresa con autorización de Sébastien Maignan et al. Science 268:291, 1995; © 1995, American Association for the Advancement of Science. Cortesía de Arnaud Ducruix.)

de fosforilación de tirosina que actúa como sitio de unión para el dominio SH2 de otra molécula STAT (fig. 15-17*c*). La fosforilación de tirosina de los sitios de unión SH2 de STAT situados dentro de un receptor dimerizado conduce al reclutamiento de proteínas STAT (fig. 15-17*c*). Cuando se relacionan con el complejo receptor, los residuos de tirosina de estas proteínas STAT se fosforilan. Como resultado de la interacción entre el residuo de tirosina fosforilado en una proteína STAT y el dominio SH2 de una segunda proteína STAT, y viceversa, estos factores de transcripción forman dímeros. Los dímeros, mas no los monómeros, se desplazan al núcleo, donde estimulan la transcripción de genes específicos participantes en una reacción inmunitaria.

- Las enzimas de señalización incluyen cinasas de proteína, fosfatasas de proteínas, cinasas de lípidos, fosfolipasas y proteínas activadoras de GTPasa (pág. 639). Cuando estas enzimas están equipadas con dominios SH2, se relacionan con RTK activadas y se activan en forma directa o indirecta como efecto de esta relación (fig. 15-17*d*). Se han identificado tres mecanismos generales por los cuales se activan estas enzimas después de su vinculación con un receptor. Las enzimas pueden activarse tan sólo como resultado de la translocación a la membrana, lo que las aproxima mucho a sus sustratos. Las enzimas también pueden activarse mediante un mecanismo alostérico (pág. 115), en el que la unión con una fosfotirosina produce un cambio en la conformación en el dominio SH2, que a su vez ocasiona un cambio en la conformación del dominio catalítico, lo que deriva en un cambio de la actividad catalítica. Por último, las enzimas pueden ser reguladas directamente por fosforilación. Como se describe más adelante, las proteínas de señalización que se relacionan con RTK activadas inician cascadas de fenómenos que inducen los cambios bioquímicos necesarios para responder a la presencia de moléculas mensajeras extracelulares.

Terminación de la respuesta La transducción de la señal por parte de las RTK casi siempre se termina con la interiorización del receptor. Aún se investiga el mecanismo exacto que causa la interiorización del receptor. Existe un mecanismo que implica la participación de una proteína de unión con receptor llamada Cb1. Cuando las RTK se activan por ligandos, fosforilan sus propios residuos de tirosina, los cuales actúan como sitio de unión para Cb1. Luego, la Cb1 se relaciona con el receptor y lleva una enzima capaz de unir una molécula de ubiquitina con el receptor. La ubiquitina es una proteína pequeña que se une de manera covalente con otras proteínas, con lo que las marca para la interiorización (pág. 314) o degradación (pág. 538). La unión del complejo Cb1 con los receptores activados va seguida por la unión del receptor con ubiquitina, la interiorización del receptor y en la mayoría de los casos la degradación en un lisosoma.

Una vez que se han explicado algunos de los mecanismos generales mediante los cuales las RTK pueden activar las vías de señalización, es posible revisar con más detalle un par de vías importantes de las RTK que se activan corriente abajo. Primero se describe la vía cinasa de Ras-MAP, que tal vez sea la cascada de señalización mejor caracterizada que se inicia con las proteintirosincinasa activadas. Se describe una cascada distinta en relación con el receptor para insulina.

La vía de cinasa de Ras-MAP

Los retrovirus son virus pequeños que portan su información genética en forma de RNA. Algunos de estos virus contienen genes, llamados oncogenes, que les permiten transformar células normales en células tumorales. Al principio, Ras se describió como un oncogén retroviral. Más tarde se descubrió que el gen retroviral que codificaba a Ras provenía de sus hospedadores mamíferos. Ahora se sabe que cerca de 30% de todos los tumores cancerosos humanos contiene versiones mutantes de los genes *RAS*. En este punto es importante hacer notar que las proteínas Ras son parte de una superfamilia de más de 100 proteínas G pequeñas, incluidas Rab (pág. 304), Sar1 (pág. 300) y Ran (pág. 490). Estas proteínas intervienen en la regulación de numerosos procesos, como división celular, diferenciación, expresión génica, organización del citoesqueleto, tráfico de vesículas y transporte nucleocitoplásmico. Los principios expues-

tos en relación con la Ras se aplican a muchos miembros de la superfamilia de proteínas G pequeñas.

Ras es una pequeña GTPasa que se mantiene en la superficie interna de la membrana plasmática por un grupo lipídico que se incrusta en la hoja interna de la bicapa (fig. 15-17*a*). La función de Ras es similar a las proteínas G heterotriméricas que se describieron antes y, como estas proteínas, Ras también actúa como un temporizador molecular. Sin embargo, a diferencia de las proteínas G heterotriméricas, Ras consiste sólo en una sola subunidad pequeña. Las proteínas Ras se encuentran en dos formas distintas: una forma activa unida con GTP y una forma inactiva unida con GDP (fig. 15-19*a*). Ras-GTP se une con proteínas de señalización corriente abajo y las activa. Ras se desactiva por la hidrólisis de su GTP unido a GDP. Las mutaciones en el gen *RAS* humano que derivan en la formación de tumores previenen que la proteína hidrolice al GTP de nueva cuenta en GDP. Como resultado, la versión mutante de Ras permanece en la posición "encendida" y envía un mensaje continuo por la vía de señalización, lo que mantiene a la célula en su modo proliferativo.

El ciclo de las proteínas G monoméricas, como Ras, entre sus estados activo e inactivo, se favorece por proteínas accesorias que se unen con la proteína G y regulan su actividad (fig. 15-19*b*). Estas proteínas accesorias incluyen las siguientes:

1. ***Proteínas activadoras de GTPasa (GAP).*** La mayoría de los monómeros de proteínas G tienen cierta capacidad para hidrolizar un GTP unido, pero su capacidad se acelera de forma notoria con la interacción con GAP específicas. Como estimulan la hidrólisis del GTP unido, que desactiva la proteína G, las GAP reducen mucho la duración de una reacción mediada por proteína G. Las mutaciones en uno de los genes Ras-GAP (*NF1*) causan neurofibromatosis 1, una enfermedad en la que los pacientes desarrollan grandes cantidades de tumores benignos (neurofibromas) a lo largo de las vainas que recubren los troncos nerviosos.
2. ***Factores de intercambio de nucleótido de guanina (GEF).*** Una proteína G inactiva se convierte en su forma activa cuando el GDP unido se sustituye por GTP. Los GEF son proteínas que se unen con su proteína G monomérica inactiva y estimulan la disociación del GDP unido. Una vez que se libera el GDP, la proteína G se une pronto con un GTP, que se encuentra en concentraciones relativamente elevadas en la célula, lo que activa a la proteína G.

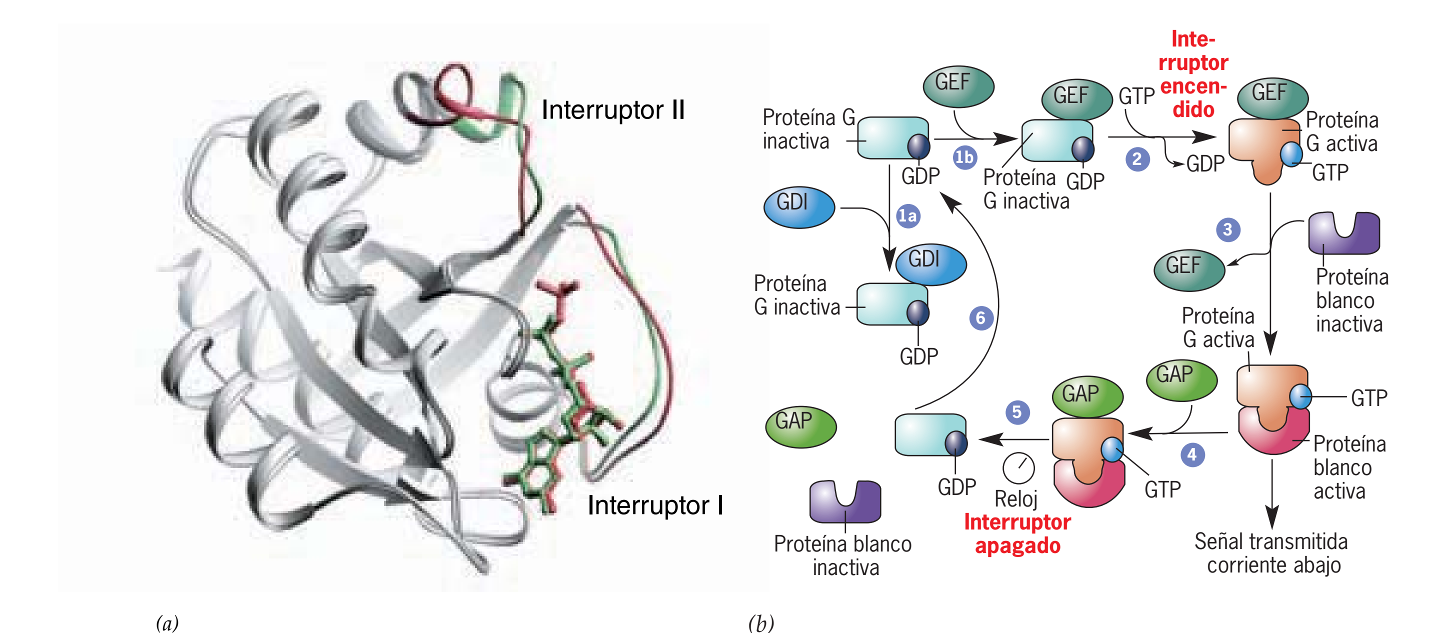


FIGURA 15-19 Estructura de una proteína G y el ciclo de la proteína G. *a*) Comparación de la estructura terciaria del estado activo unido con GTP (rojo) y el estado inactivo unido con GDP (verde) de la pequeña proteína G Ras. Se muestra un nucleótido de guanina unido en la forma de esferas y cilindros. Las diferencias de la conformación ocurren en dos regiones flexibles de la molécula que se conocen como interruptores I y II. La diferencia de la conformación mostrada aquí afecta la capacidad de la molécula para unirse con otras proteínas. *b*) Ciclo de la proteína G. Las proteínas G se hallan en su estado inactivo cuando se les une una molécula de GDP. Si la proteína G inactiva interactúa con un inhibidor de disociación de nucleótido de guanina (GDI), se inhibe la liberación de GDP y la proteína permanece en el estado inactivo (paso 1a). Si la proteína G inactiva interactúa con un factor de intercambio de nucleótido de guanina (GEF, paso 1b), la proteína G intercambia su GDP por un GTP (paso 2), lo cual activa a la proteína G para que pueda unirse con una proteína blanco corriente abajo (paso 3). La unión con la proteína G unida con GTP activa a la proteína blanco, la cual casi siempre es una enzima, como una cinasa de proteína o una proteína fosfatasa. Esto tiene el efecto de transmitir la señal más allá sobre la vía de señalización. Las proteínas G poseen una débil actividad intrínseca de GTPasa que se estimula con la interacción con una proteína activadora de GTPasa (GAP) (paso 4). El grado de estimulación de la GTPasa por una GAP determina la duración que una proteína G permanece activa. Por consiguiente, la GAP sirve como un tipo de reloj que regula la duración de la respuesta (paso 5). Una vez que se hidroliza el GTP, el complejo se disocia y la proteína G inactiva está lista para iniciar un nuevo ciclo (paso 6). (*A*, TOMADA DE STEVEN J. GAMBLIN Y STEPHEN J. SMERDON, STRUCT 7:R200, 1999.)

3. ***Inhibidores de disociación del nucleótido de guanina (GDI).*** Las GDI son proteínas que inhiben la liberación de un GDP unido de una proteína G monomérica, lo que mantiene a la proteína en su estado inactivo unido con GDP.

Se piensa que Ras-GTP interactúa directamente con varios blancos corriente abajo. Aquí se analizará Ras como un componente de la **cascada de la cinasa de MAP-Ras**, que se activa en respuesta a una amplia variedad de señales extracelulares y tiene una función central en la regulación de actividades vitales como la proliferación y la diferenciación celulares. La vía releva señales extracelulares de la membrana plasmática a través del citoplasma y hacia el núcleo. La figura 15-20 muestra una representación general de la vía. Esta vía se activa cuando un factor de crecimiento, como EGF o PDGF, se une con el dominio extracelular de su RTK. Muchas RTK activadas tienen residuos de tirosina fosforilados que actúan como sitios de acoplamiento para la proteína adaptadora Grb2. A su vez, Grb2 se une con Sos, que es un factor de intercambio de nucleótido de guanina (un GEF) para Ras. La creación de un sitio de unión para Grb2 en un receptor activado promueve el traslado de Grb2-Sos del citoplasma a la superficie citoplásmica de la membrana plasmática, muy cerca de Ras (como en la figura 15-17*a*).

El puro traslado de Sos a la membrana plasmática es suficiente para activar a Ras. Esto lo ilustró un experimento con una versión mutante de Sos que se mantiene siempre unida con la superficie interna de la membrana plasmática. La expresión de esta Sos mutante unida a la membrana causa la activación constitutiva de Ras y la transformación de la célula en un fenotipo maligno. La interacción con Sos abre el sitio de unión para el nucleótido de Ras. Como resultado, GDP se libera y se sustituye por GTP. El intercambio de GDP por GTP en el sitio de unión para nucleótido de Ras induce un cambio de conformación y la creación de una interfase de unión para una proteína de señalización importante llamada Raf. Luego, Raf se congrega en la superficie interna de la membrana plasmática, donde se activa. Para que Raf se active es necesaria la fosforilación de varias cinasas de proteína y es probable que incluya interacciones entre proteínas que se regulan por estos fenómenos de fosforilación. Se desconoce el mecanismo preciso de la activación de Raf.

Raf es una cinasa de proteína serina-treonina. Uno de sus sustratos es la cinasa de proteína MEK (fig. 15-20). MEK, que se activa como consecuencia de la fosforilación por Raf, fosforila y activa dos cinasas de MAP llamadas Erk-1 y Erk-2. Se han identificado más de 160 proteínas que pueden ser fosforiladas por estas cinasas, incluidos factores de transcripción, cinasa de

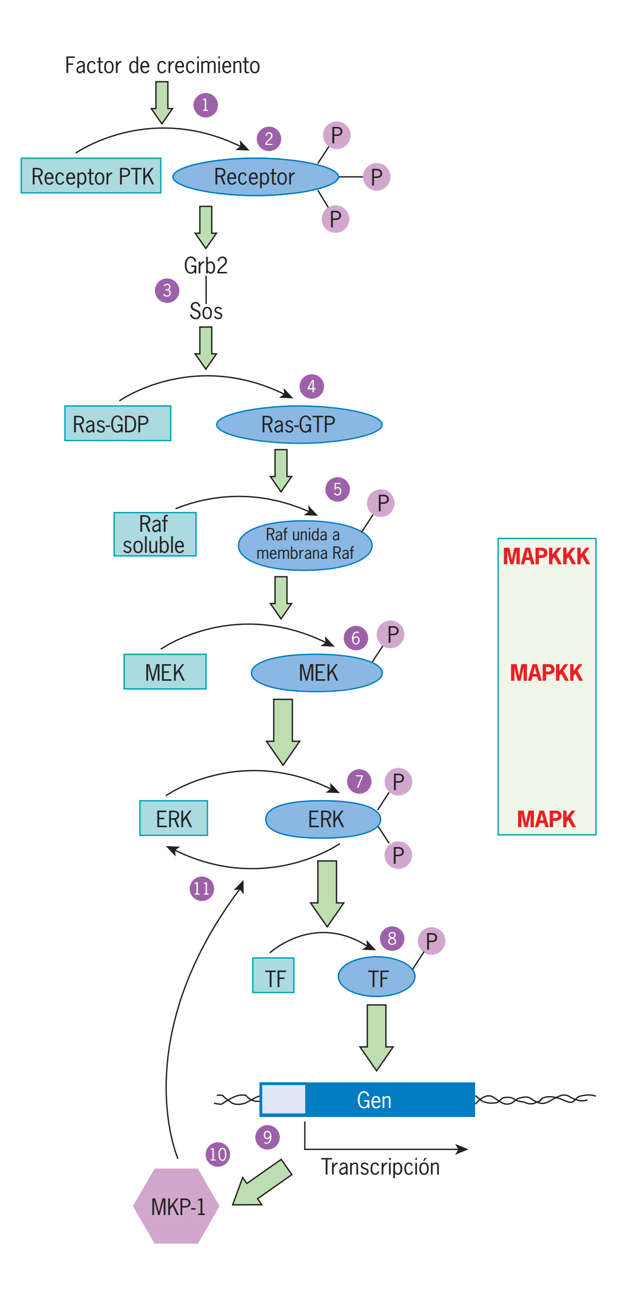


FIGURA 15-20 Los pasos de una cascada de cinasa de MAP generalizada. La unión de un factor de crecimiento con su receptor (paso 1) conduce a la autofosforilación de residuos de tirosina del receptor (paso 2) y el reclutamiento subsiguiente de proteínas Grb2-Sos (paso 3). Este complejo provoca el intercambio GTP-GDP de Ras (paso 4), la cual recluta a la proteína Raf a la membrana, donde se fosforila por una cinasa desconocida y así se activa (paso 5). En la vía mostrada en esta figura, Raf se fosforila y activa a otra cinasa llamada MEK (paso 6), la que a su vez se fosforila y activa a otra cinasa más llamada ERK (paso 7). Este esquema de fosforilación en tres pasos mostrado en los pasos 5 a 7 es característico de todas las cascadas de cinasas de MAP. Por su actividad de cinasa en secuencia, Raf se conoce como una MAPKKK (cinasa de cinasa de cinasa de MAP), MEK es una MAPKK (cinasa de cinasa de MAP) y ERK como una MAPK (cinasa de MAP). Las MAPKK son cinasas de doble especificidad, término que denota que pueden fosforilar residuos de tirosina, serina y treonina. Todas las MAPK tienen un tripéptido cerca de su sitio catalítico con la secuencia Tre-X-Tir. MAPKK fosforila a MAPK en el residuo de treonina y el de tirosina de esta secuencia, con lo que se activa la enzima (paso 7). Una vez activada, la MAPK se traslada al núcleo, donde fosforila factores de transcripción (TF, paso 8), como Elk-1. La fosforilación de los factores de transcripción incrementa su afinidad por los sitios reguladores en el DNA (paso 9), lo que conduce a un aumento de la transcripción de genes específicos (p. ej., *Fos* y *Jun*) que intervienen en la respuesta de crecimiento. Uno de los genes cuya expresión se estimula codifica una fosfatasa MAPK (MKP-1, paso 10). Los miembros de la familia MKP pueden retirar grupos fosfato de los residuos de tirosina y treonina de MAPK (paso 11), lo cual desactiva la MAPK y detiene la actividad de señalización en la vía. (Tomada de H. Sun y N. K. Tonks, Trends Biochem Sci 19:484, 1994.)

proteína, proteínas citoesqueléticas, reguladores de la apoptosis, receptores y otras proteínas señalizadoras. Una vez activada, la cinasa de MAP puede ingresar al núcleo, donde se fosforila y activa factores de transcripción específicos, como Elk-1. Al final, la vía conduce a la activación de genes participantes en la proliferación celular, incluida la ciclina D1, que tiene un papel clave en el paso de la célula de G_1 a la fase S (fig. 14-8).

Como se explica en el capítulo siguiente, los oncogenes se identifican por su capacidad para hacer que las células se vuelvan cancerosas. Los oncogenes provienen de genes celulares normales que mutaron o tienen una expresión excesiva. Muchas de las proteínas que participan en la vía de señalización de Ras se descubrieron porque se codifican en oncogenes causantes de cáncer. Esto incluye a los genes de Ras, Raf y varios de los factores de transcripción activados al final de la vía (p. ej., Fos y Jun). Los genes de varias RTK situadas al principio de la vía, incluidos los receptores para EGF y PDGF, también se identificaron entre las varias docenas de oncogenes conocidos. El hecho de que tantas proteínas de esta vía estén codificadas por genes que pueden causar cáncer cuando mutan subraya la importancia de la vía en el control del crecimiento y proliferación celulares.

Adaptación de la cinasa de MAP para transmitir diferentes tipos de información La misma vía básica para las RTK a través de Ras hacia la activación de los factores de transcripción, ilustrada en la figura 15-20, se encuentra en todos los eucariotas investigados, desde levaduras, moscas y nematodos hasta los mamíferos. La evolución adaptó la vía para satisfacer muchas necesidades distintas. Por ejemplo, en las levaduras es necesaria la cascada de la cinasa de MAP para que las células respondan a las feromonas de apareamiento; en las moscas de la fruta, la vía se utiliza durante la diferenciación de los fotoreceptores en el ojo compuesto y en las plantas con flor, la vía transmite señales que inician una defensa contra patógenos. En cada caso, el centro de la vía contiene un trío de enzimas que actúan una después de la otra: una cinasa de cinasa de cinasa de MAP (MAPKKK), una cinasa de cinasa de MAP (MAPKK) y una cinasa de MAP (MAPK) (fig. 15-20). A cada uno de estos componentes lo representa una pequeña familia de proteínas. Hasta ahora se han reconocido 14 MAPKKK, 7 MAPKK y 13 MAPK diferentes en los mamíferos. Al usar distintos miembros de estas familias de proteínas, los mamíferos pueden ensamblar varias vías distintas de la cinasa de MAP que transmiten diversos tipos de señales extracelulares. Ya se describió cómo se transmiten los estímulos mitógenos por un tipo de vía de cinasa de MAP que conduce a la proliferación celular. En cambio, cuando las células se exponen a estímulos estresantes, como los rayos X o sustancias dañinas, se transmiten señales por diferentes vías de cinasa de MAP que hacen que la célula detenga su ciclo celular en lugar de continuarlo, como se indica en la figura 15-20. El paro del ciclo celular da tiempo a la célula para reparar el daño ocasionado por las condiciones adversas.

Estudios recientes se enfocaron en la especificidad de las señales de las cascadas de cinasa de MAP en un intento por comprender de qué manera las células pueden utilizar proteínas similares como componentes de vías que inducen respuestas celulares distintas. Los estudios de secuencias de aminoácidos y estructura proteica indican que parte de la respuesta radica en las interacciones selectivas entre las enzimas y los sustratos. Por ejemplo, ciertos miembros de la familia de MAPKKK fosforilan a miembros específicos de la familia de MAPKK, que a su vez hacen lo mismo con miembros específicos de la familia MAPK. Sin embargo, muchos integrantes de estas familias pueden participar en más de una vía de señalización de la cinasa de MAP.

La especificidad en las vías de la cinasa de MAP también se logra con la localización espacial de las proteínas que las componen. La ubicación espacial se logra mediante proteínas estructurales (no enzimáticas) conocidas como *proteínas de andamiaje*, cuya función aparente es fijar a los integrantes apropiados de una vía de señalización en una orientación espacial específica que intensifica sus interacciones mutuas. Las proteínas de andamiaje también pueden participar activamente en la señalización de procesos al inducir un cambio en la conformación de proteínas ligadas. Además de promover una serie particular de reacciones, las proteínas de andamiaje pueden impedir que las proteínas que participan en una vía de señalización lo hagan en otras. Con base en esta sección del capítulo, resulta evidente que las vías de transducción de señalización de la célula son muy complejas. Esto hace que este tema sea desafiante, sea para los estudiantes o los biólogos (fig. 15-21).

Señalización del receptor para insulina

El cuerpo humano hace un esfuerzo considerable para mantener los niveles de glucosa sanguínea en límites estrechos. Un descenso de los niveles de glucosa sanguínea puede provocar la pérdida de la conciencia y coma, ya que el sistema nervioso central depende en notable medida de la glucosa para su metabolismo energético. Un aumento persistente de la concentración de glucosa en la sangre (la glucemia) produce pérdida de glucosa, líquidos y electrólitos en la orina y graves problemas de salud. El páncreas controla los valores de glucosa en la circulación. Cuando la glucemia disminuye por debajo de determinado intervalo, las células α pancreáticas secretan glucagon. Como ya se dijo, el glucagon actúa a través de los GPCR y estimula la degradación de glucógeno, de lo que resulta un aumento de la glucemia. Cuando ésta se eleva, como ocurre después de una comida rica en carbohidratos, las células beta del páncreas reaccionan con la secreción de insulina. Esta última funciona como un mensajero extracelular e informa a las células que los niveles de glucosa están incrementados. Las células que expresan receptores para insulina en su superficie, como las hepáticas, responden a este mensaje con el aumento de la captación de glucosa, lo que eleva la síntesis de glucógeno y triglicéridos y reduce la gluconeogénesis.

El receptor para insulina es una proteintirosincinasa Cada receptor para insulina está formado por una cadena alfa y una beta, que provienen de un solo precursor proteico por procesamiento proteolítico. La cadena alfa es extracelular y contiene el sitio para unión con la insulina. La cadena beta está formada por una región extracelular, una sola región transmembranosa y una región citoplásmica (fig. 15-22). Las cadenas alfa y beta están unidas por enlaces disulfuro (fig. 15-22). Dos de estos heterodímeros αβ se mantienen juntos por enlaces disulfuro entre las cadenas alfa. Por lo tanto, mientras se cree que la mayoría de las RTK están en la superficie celular como monómeros, los receptores para insulina se hallan como dímeros estables. Al igual que otras RTK, los receptores para insulina están inactivos en ausencia de ligando (fig. 15-22*a*). Los trabajos recientes sugieren que el dímero receptor para insulina se une con una sola molécula

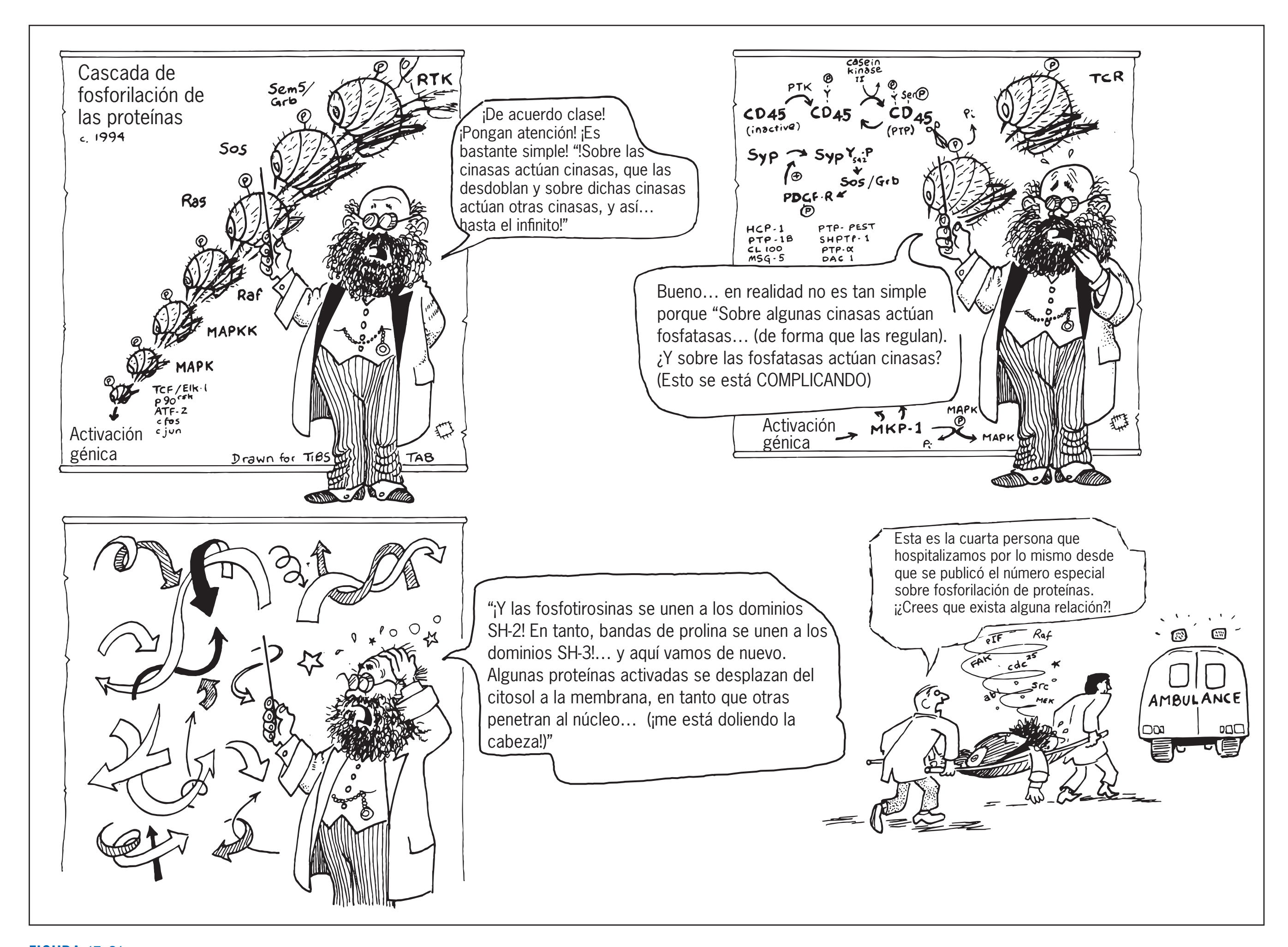


FIGURA 15-21 (Historieta de Tony Bramley tomada de Trends Biochem Sci 19:469, 1994.)

de insulina. Esto produce una recolocación de los dominios de unión con ligandos en el exterior de la célula, lo que a su vez hace que los dominios cinasa de tirosina del interior de la célula se aproximen entre sí (fig. 15-22*b*). La yuxtaposición de los dominios cinasa da lugar a la transautofosforilación y activación del receptor (fig. 15-22*c*).

Se han identificado varios sitios de fosforilación de tirosina en la región citoplásmica del receptor para insulina. Tres de estos sitios de fosforilación se hallan en el asa de activación. En el estado no fosforilado, el asa de activación asume una conformación en la que ocupa el sitio activo. Cuando se fosforilan los tres residuos de tirosina, el asa de activación asume una nueva conformación lejos de la hendidura catalítica. Esta nueva conformación requiere una rotación de los lóbulos pequeños y grandes del dominio cinasa respecto de ellos mismos, lo que aproxima a los residuos esenciales para la catálisis. Además, el asa de activación deja abierta de ese modo la hendidura catalítica para que pueda unirse con sus sustratos. Después de la activación del dominio cinasa, el receptor se fosforila a sí mismo en los residuos de tirosina que se encuentran adyacentes a la membrana y en la cola del extremo carboxilo (fig. 15-22*c*).

Sustratos 1 y 2 del receptor para insulina La mayoría de las RTK posee sitios para autofosforilación que reclutan en forma directa a proteínas de señalización con dominios SH2 (como en la figura 15-17*a, c* y *d*). El receptor para insulina es una excepción a esta regla general porque se relaciona con una pequeña familia de proteínas de acoplamiento (fig. 15-17*b*), llamada **sustratos del receptor para insulina** (**IRS**). A su vez, los IRS suministran sitios para la unión de proteínas de señalización que contienen dominio SH2. Después de la unión con el ligando y la activación por cinasa, el receptor fosforila su propia tirosina 960, que luego forma un sitio de unión para los dominios de unión con fosfotirosina (PTB) de los sustratos del receptor para insulina. Como se indica en la figura 15-23*a*, los sustratos del receptor para insulina se caracterizan por la presencia de un dominio PH en el extremo N, un dominio PTB y una larga cola que contiene sitios para fosforilación de tirosina. El dominio PH puede interactuar con los fosfolípidos presentes en la hoja interna de la membrana plasmática, el dominio PTB se une con los sitios de fosforilación de tirosina en el receptor activado y los sitios de fosforilación para tirosina proporcionan sitios para acoplamiento de las proteínas de señalización que contienen dominios SH2.

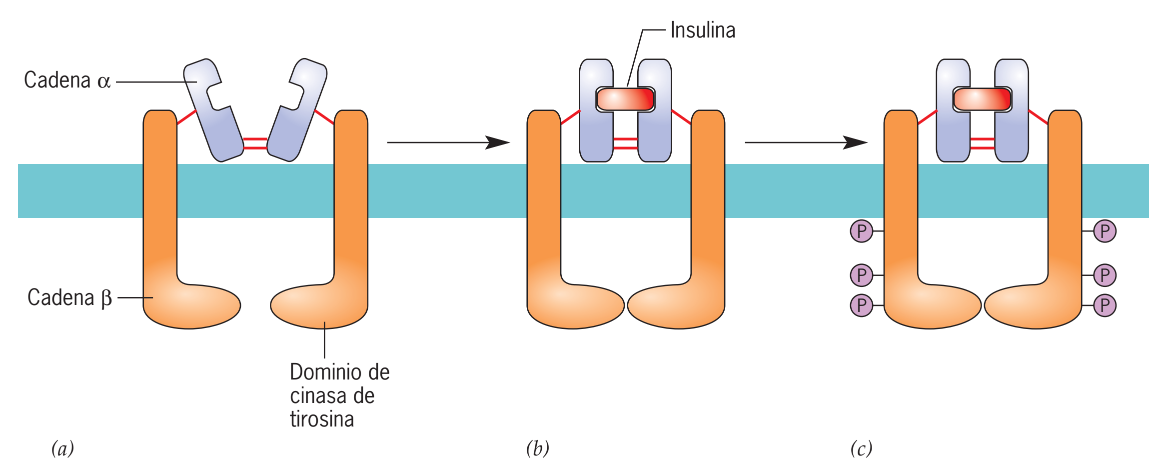


FIGURA 15-22 Respuesta del receptor para insulina a la unión con ligando. *a*) El receptor para insulina, mostrado aquí de forma esquemática en su estado inactivo, es un tetrámero que consiste en dos subunidades alfa y dos beta. *b*) La unión de una sola molécula de insulina con las subunidades alfa produce un cambio de conformación en las subunidades beta, lo cual inicia la actividad de cinasa de tirosina de las subunidades beta. *c*) Las subunidades beta activadas fosforilan residuos de tirosina situados en el dominio citoplásmico del receptor, así como los residuos de tirosina en varios sustratos del receptor para insulina (IRS) que se describen más adelante.

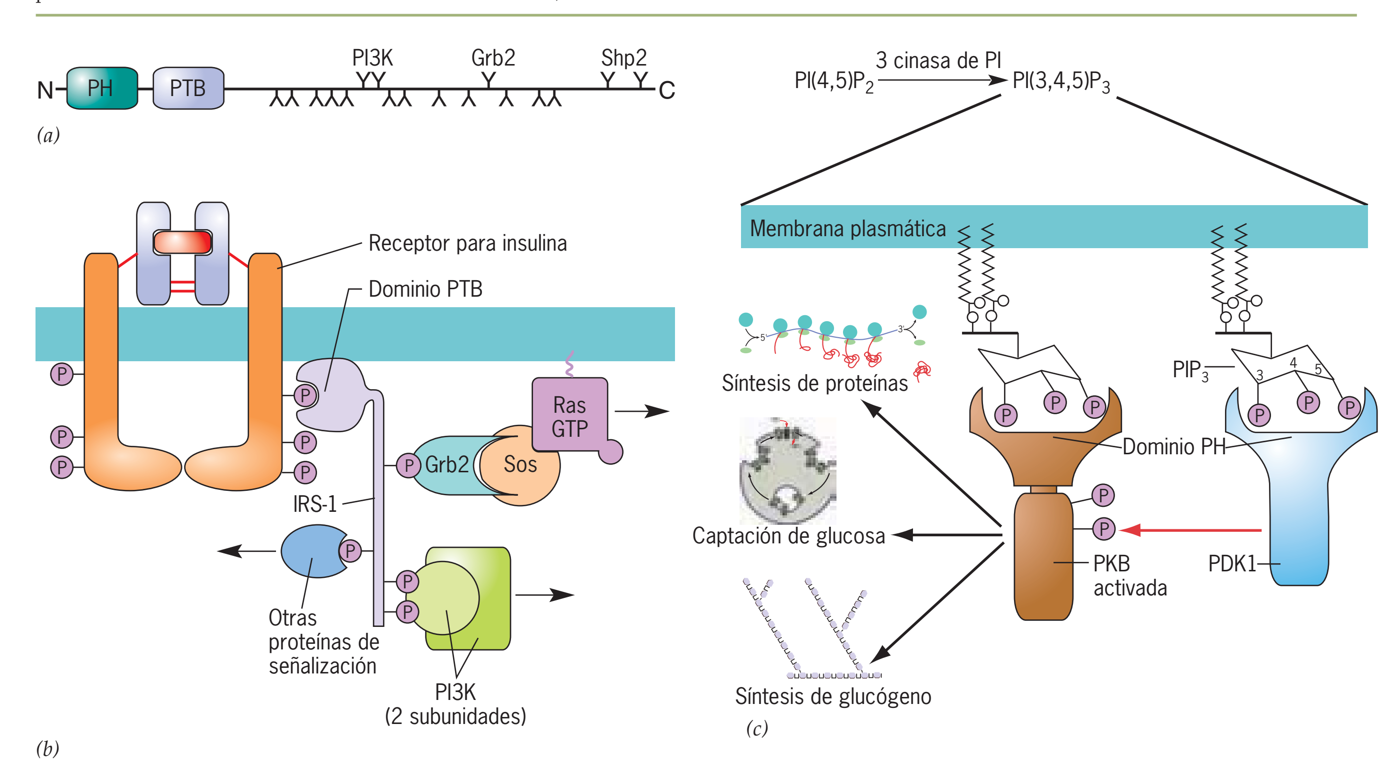


FIGURA 15-23 Función del IRS de tirosina fosforilado en la activación de varias vías de señalización. *a*) Representación esquemática de un polipéptido IRS. La porción del extremo N de la molécula contiene un dominio PH que le permite unirse con fosfoinosítidos de la membrana y uno PTB que posibilita unirse con un residuo específico de tirosina fosforilada (núm. 960) en el dominio citoplásmico de un receptor para insulina activado. Una vez unido con el receptor para insulina, pueden fosforilarse varios residuos de tirosina del IRS (indicados como Y). Estas tirosinas fosforiladas sirven como sitios de unión para otras proteínas, incluida una lipasa (PI3K), una proteína adaptadora (Grb2) y una proteintirosinfosfatasa (Shp2). *b*) Se sabe que la fosforilación del IRS por el receptor de insulina activado activa las vías de PI3K y Ras, que se describen en el capítulo. Otras vías aún no bien definidas también las activan los IRS. (El IRS se representa como una molécula bidimensional extendida para los fines de la ilustración.) *c*) La activación de PI3K conduce a la formación de fosfoinosítidos unidos con la membrana, incluidas las PIP_3. Una de las cinasas clave en muchas vías de señalización es PKB, que interactúa en la membrana plasmática con PIP_3 mediante un dominio PH en la proteína. Esta interacción cambia la conformación de la molécula PKB, lo que la convierte en sustrato para otra cinasa unida con PIP_3 (PDK1) que fosforila a PKB. El segundo fosfato que se muestra unido con PKB se agrega por efecto de una segunda cinasa, más probablemente mTOR. Una vez activada, PKB se disocia de la membrana plasmática y se mueve hacia el citosol y el núcleo. PKB es el principal componente de varias vías de señalización separadas que median la respuesta a la insulina. Estas vías conducen al traslado de transportadores de glucosa a la membrana plasmática, síntesis de glucógeno y síntesis de nuevas proteínas en la célula.

Se han identificado por lo menos cuatro miembros de la familia IRS. Con base en los resultados conseguidos en experimentos con ratones manipulados de forma genética, se cree que IRS-1 y IRS-2 son los más importantes para la señalización del receptor para insulina.

La autofosforilación del receptor para insulina activado al nivel de la tirosina 960 proporciona un sitio para la unión de IRS-1 y IRS-2. Sólo después de establecer una relación estable con IRS-1 o IRS-2, el receptor para insulina activado puede fosforilar los residuos de tirosina presentes en las proteínas de acoplamiento (fig. 15-23*b*). IRS-1 y IRS-2 tienen una gran cantidad de sitios potenciales para la fosforilación de tirosina. Los que se han reconocido con certeza forman sitios para la unión con los dominios SH2 de la 3-cinasa de PI, Grb2 y Shp2 (fig. 15-23*a*, *b*). Estas proteínas se relacionan con IRS-1 o IRS-2 unidos con el receptor y activan las vías de señalización corriente abajo.

La *3-cinasa de PI* (*PI3K*) se forma con dos subunidades, una contiene dos dominios SH2 y la otra el dominio catalítico (fig. 15-23*b*). La 3-cinasa de PI, que se activa en forma directa como consecuencia de la unión de sus dos dominios SH2 con los sitios para fosforilación de tirosina, fosforila a los fosfoinosítidos en la posición 3 del anillo inositol (fig. 15-23*c*). Los productos de esta enzima, que incluyen 3,4-difosfato de PI (PIP_2) y 3,4,5-trifosfato de PI (PIP_3), permanecen en la hoja citosólica de la membrana plasmática, donde proporcionan sitios para la unión de proteínas de señalización con dominios PH, como las cinasas de serina-treonina PKB y PDK1. Como se indica en la figura 15-23*c*, la PKB (también llamada Akt) participa en la mediación de la respuesta a insulina y a otras señales extracelulares. El reclutamiento de PDK1 en la membrana plasmática, en estrecha proximidad con PKB, crea un entorno en el que la PDK1 puede fosforilar y activar la PKB (fig. 15-23*c*). Si bien la fosforilación por PDK1 es esencial, no es suficiente para la activación de PKB, la cual depende además de la fosforilación por una segunda cinasa, más probablemente mTOR.

Transporte de glucosa La PKB interviene en forma directa en la regulación del transporte de glucosa y la síntesis de glucógeno. El transportador de glucosa GLUT4 realiza el transporte de glucosa dependiente de insulina (pág. 157). En ausencia de insulina, GLUT4 se encuentra en las vesículas con membrana en el citoplasma de células que responden a la insulina (fig. 15-24). Estas vesículas se fusionan con la membrana plasmática como respuesta a la insulina, un proceso que se conoce como translocación de GLUT4. El aumento de la cantidad de transportadores de glucosa en la membrana plasmática incrementa la captación de glucosa (fig. 15-24). La transposición de GLUT4 depende de la activación de 3-cinasa de PI y PKB. Esta conclusión se basa en experimentos que muestran que los inhibidores de PI3K bloquean la transposición de GLUT4. Además, la sobrexpresión de PI3K o PKB estimula la transposición de GLUT4. Es bien sabido que muchos receptores activan la PI3K, mientras que sólo el receptor de insulina estimula la transposición de GLUT4. Esto sugiere que existe una segunda vía corriente abajo del receptor de insulina que es esencial para que ocurra la transposición de GLUT4. Aún no se ha encontrado una explicación detallada del modo en que las dos vías trabajan en conjunto para estimular la transposición de GLUT4.

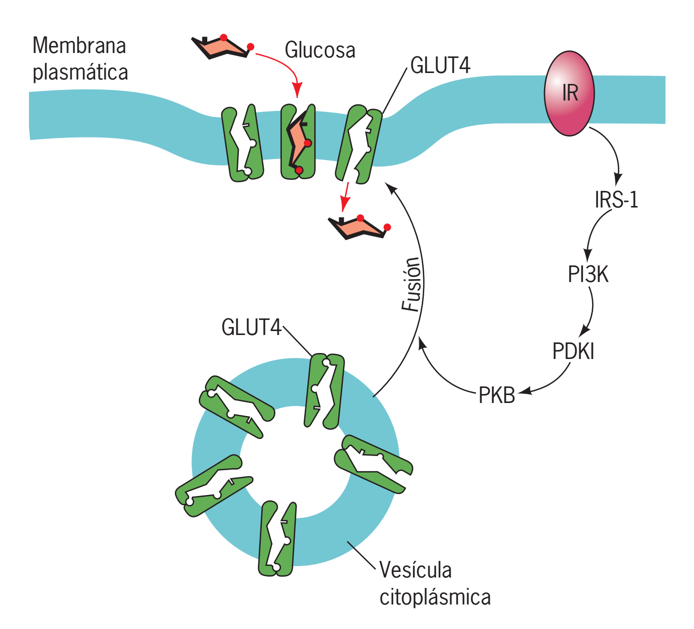


FIGURA 15-24 Regulación de la captación de glucosa en las células musculares y adiposas por efecto de la insulina. Los transportadores de glucosa se almacenan en las paredes de vesículas citoplásmicas que se forman por gemación de la membrana plasmática (endocitosis). Cuando el nivel de insulina aumenta, se transmite una señal por la vía IRS-PI3K-PKB, lo cual inicia la translocación de vesículas citoplásmicas a la periferia celular. Las vesículas se fusionan con la membrana plasmática (exocitosis), lo que lleva a los transportadores a la superficie celular, donde pueden mediar la captación de glucosa. No se muestra una segunda vía que lleva del receptor de insulina a la transposición de GLUT4 (véase *Trends Biochem. Sci.* 31:215, 2006). (Según D. Voet y J. G. Voet, Biochemistry, 2nd ed. © 1995, John Wiley & Sons, Inc. Reimpresa con autorización de John Wiley & Sons, Inc.)

El exceso de glucosa que captan las células musculares y hepáticas se almacena en forma de glucógeno. La síntesis de glucógeno se lleva a cabo por acción de la sintetasa del glucógeno, una enzima que se desactiva con la fosforilación en los residuos de serina y treonina. La cinasa-3 de la sintetasa del glucógeno (GSK-3) se identificó como un regulador negativo de la enzima. A su vez, la GSK-3 se desactiva después de la fosforilación de PKB. Por lo tanto, la activación de la vía de 3-cinasa de PI-PKB como reacción a la insulina conduce a un descenso de la actividad de la cinasa de GSK-3, lo que incrementa la actividad de la sintetasa del glucógeno (fig. 15-23*c*). La activación de la fosfatasa 1 de proteína, una enzima cuya función conocida es desfosforilar a la enzima en cuestión, contribuye aún más a la activación de la misma.

Diabetes mellitus Una de las enfermedades humanas más frecuentes, la diabetes, se debe a defectos de la señalización de la insulina. Hay dos clases de diabetes: tipo 1, que representa 5 a 10% de todos los casos, y tipo 2, que corresponde al restante 90 a 95% . La diabetes tipo 1 se debe a la incapacidad para producir insulina y se describe en la sección Perspectiva humana del capítulo 17. La diabetes tipo 2 es una enfermedad más compleja cuya incidencia va en aumento en todo el mundo a un ritmo alarmante. Lo más probable es que la incidencia creciente de

la afección sea resultado de un cambio en el estilo de vida y los hábitos alimentarios. Se cree que una dieta alta en calorías combinada con un estilo de vida sedentario conduce a la secreción crónica de la insulina. Los niveles elevados de insulina estimulan demasiado a las células blanco del hígado y en todas partes del cuerpo, lo cual conduce a una situación conocida como *resistencia a la insulina*, en la que estas células blanco dejan de responder a la presencia de la hormona. Esta conclusión la respaldan los experimentos genéticos en ratones que muestran que las mutaciones en los genes para el receptor de la insulina o IRS-2, que torna a las células incapaces de reaccionar a la insulina, crean un fenotipo diabético. Sin embargo, las mutaciones en estos genes son raras en la población humana y aún se desconoce la razón exacta de la resistencia a la insulina.

Sin importar cuál sea el mecanismo que cause la resistencia a la insulina, produce un nivel elevado de glucosa en la sangre porque las células del cuerpo no pueden retirar azúcar suficiente de la sangre. La concentración alta de glucosa sanguínea estimula la secreción adicional de insulina en el páncreas, mientras el cuerpo intenta aumentar la captación de glucosa en los tejidos periféricos. Este círculo vicioso de resistencia periférica a la insulina y mayor secreción de insulina conduce en muchos casos a la destrucción de las células beta del páncreas. Una de las medidas terapéuticas para la diabetes consiste en prevenir la resistencia a la insulina, es decir, volver a las células más sensibles a esta hormona.

Los ratones que carecen de reguladores negativos de señalización del receptor para insulina, como la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B), tienen un aumento marcado de la sensibilidad a la insulina. Esto sugiere que las proteínas que participan en la vía de transducción de señal de la insulina pueden usarse como blancos para los fármacos antidiabéticos. Esto lo ilustran las observaciones siguientes. La PTP-1B es una fosfatasa que al parecer elimina grupos fosfato de residuos de tirosina en el receptor para la insulina, lo que desactiva al receptor y detiene la respuesta a la hormona. En condiciones normales, los ratones que se alimentan con dietas ricas en grasa desarrollan resistencia a la insulina característica de la diabetes tipo 2 y también se vuelven obesos. En cambio, los ratones que carecen de PTP-1B (es decir, con desactivación de PTB-1B) y reciben una dieta rica en grasa desarrollan una mayor sensibilidad a la insulina y mantienen un nivel sanguíneo de glucosa y peso corporal normales. Se presume que la ausencia de la fosfatasa PTP-1B en estos ratones manipulados de modo genético interfiere con la desactivación del receptor, lo que acentúa la sensibilidad de los animales a la insulina. Estos estudios señalan un tratamiento para la diabetes con fármacos que inhiben de manera específica la versión humana de PTP-1B. Por lo tanto, en la actualidad se investiga la PTP-1B como blanco farmacológico para la terapéutica de la diabetes y la obesidad.

Vías de señalización en las plantas

Las plantas y animales comparten ciertos mecanismos básicos de señalización, como el uso de mensajeros Ca^{2+} y fosfoinosítido, pero otras vías son únicas de cada reino. Por ejemplo, los nucleótidos cíclicos, que pueden ser más ubicuos en los mensajeros celulares animales, pero parecen tener una función menor o nula en la señalización de la célula vegetal. Las cinasas de tirosina receptoras tampoco existen en las células vegetales. Por otro lado, como se explica más adelante, las plantas contienen un tipo de cinasa de proteína que no existe en las células animales.

Desde hace mucho se sabe que las células bacterianas tienen una cinasa de proteína que fosforila residuos de histidina y media la respuesta celular a varias señales ambientales. Hasta 1993 se pensaba que estas enzimas se limitaban a las bacterias, pero luego se descubrió en levaduras y plantas con flor. En ambos tipos de eucariotas, las enzimas eran proteínas transmembranosas con un dominio extracelular que actúa como receptor para los estímulos externos y un dominio histidincinasa citoplásmico que transmite la señal al citoplasma. Una de las proteínas vegetales mejor estudiadas se codifica en el gen *Etr1*. El producto de este gen codifica un receptor para el gas etileno (C_2H_4), una hormona vegetal que regula un conjunto diverso de procesos del desarrollo, incluida la germinación de semillas, floración y maduración de frutos. La unión del etileno con su receptor conduce a la transmisión de señales por una vía que es muy similar a la cascada de cinasa de MAP que se encuentra en levaduras y células animales. Como en otros eucariotas, los blancos corriente abajo de la vía de la cinasa de MAP en las plantas son factores de transcripción que activan la expresión de genes específicos que codifican las proteínas necesarias para la respuesta hormonal. Conforme los investigadores analicen la enorme cantidad de datos obtenidos de la identificación de la secuencia de *Arabidopsis* y otros genomas vegetales, serán más aparentes las similitudes y diferencias entre las vías de señalización de plantas y animales.

REVISIÓN ?

1. Describa los pasos entre la unión de una molécula de insulina en la superficie de una célula blanco y la activación del efector PI3K. ¿En qué difiere la acción de la insulina de la de otros ligandos que actúan mediante las cinasas de tirosina receptoras?
2. ¿Cuál es la función de Ras en las vías de señalización?, ¿cómo se afecta por la actividad de Ras-GAP?, ¿en qué difiere Ras de la proteína G heterotrimérica?
3. ¿Qué es un dominio SH2 y qué papel tiene en las vías de señalización?
4. ¿Cómo altera la cascada de cinasa de MAP la actividad de transcripción de la célula?
5. ¿Cuál es la relación entre la diabetes tipo 2 y la producción de insulina?, ¿de qué forma un fármaco que incrementa la sensibilidad a la insulina podría ayudar a tratar esta enfermedad?

15.5 LA FUNCIÓN DEL CALCIO COMO MENSAJERO INTRACELULAR

Los iones de calcio tienen un papel significativo en una gran variedad de actividades celulares, entre ellas la contracción muscular, división celular, secreción, fecundación, transmisión sináptica, metabolismo, transcripción, movimiento celular y apoptosis. En cada uno de estos casos, se recibe un mensaje extracelular en la superficie de la célula el cual produce un

aumento drástico de la concentración de iones calcio dentro del citosol. La concentración de iones calcio en un compartimiento celular particular está bajo el control de la actividad regulada de las bombas de Ca^{2+} y los canales iónicos para Ca^{2+} que se localizan dentro de las membranas que rodean el compartimiento. La concentración de iones Ca^{2+} en el citosol de una célula en reposo se mantiene en niveles muy bajos, casi siempre alrededor de 10^{-7} M. En cambio, la concentración de los iones en el espacio extracelular o dentro de la luz del retículo endoplásmico o una vacuola vegetal es 10 000 veces más alta que en el citosol. El nivel citosólico de calcio se mantiene muy bajo porque: 1) los canales iónicos para Ca^{2+} de las membranas plasmática y del retículo endoplásmico se mantienen cerrados, lo que hace que estas membranas sean muy impermeables a este ion, y 2) los sistemas de transporte del Ca^{2+} impulsados por ATP de las membranas plasmáticas y del retículo endoplásmico bombean calcio fuera del citosol.[2] El aumento anormal de la concentración citosólica de Ca^{2+}, como ocurre a veces por ejemplo en las células cerebrales después de un accidente vascular cerebral, puede ocasionar muerte celular masiva.

IP_3 y canales del Ca^{2+} controlados por voltaje En páginas anteriores ya se describieron dos tipos principales de receptores de señales, los GPCR y los RTK. En la página 627 se mencionó que la interacción de una molécula mensajera extracelular con un GPCR puede conducir a la activación de la enzima fosfolipasa C-beta, que divide al fosfoinosítido PIP_2 para liberar la molécula IP_3, la cual abre los canales del calcio en la membrana del retículo endoplásmico y aumenta la concentración citosólica de Ca^{2+}. Los mensajeros extracelulares que transmiten señales mediante RTK pueden iniciar una reacción similar. La principal diferencia es que los RTK activan miembros de la subfamilia de la fosfolipasa C-gamma, la cual tiene un dominio SH2 que les permite unirse con la RTK fosforilada activada. Existen otras dos isoformas de PLC, a saber: PLCδ, que es activada por iones Ca^{2+}, y PLCϵ, que es activada por Ras-GTP. Las cuatro isoformas de PLC catalizan la misma reacción, que produce IP_3 y vincula una multitud de receptores de la superficie celular con un aumento en el Ca^{2+} citoplásmico. Existe otra vía importante que conduce al incremento de la $[Ca^{2+}]$ citosólica, que se incluyó en la descripción sobre la transmisión sináptica de la página 169. En este caso, un impulso nervioso induce la despolarización de la membrana plasmática, lo cual abre los canales del calcio activados por voltaje en la membrana plasmática, y ello posibilita el ingreso de iones calcio.

Visualización de la concentración citoplásmica de Ca^{2+} en tiempo real La comprensión del papel de los iones Ca^{2+} en las respuestas celulares ha avanzado mucho con el desarrollo de moléculas indicadoras que emiten luz en presencia de calcio libre. A mediados del decenio de 1980 se desarrollaron nuevos tipos de compuestos de unión con calcio fluorescentes y muy sensibles (p. ej., *fura*-2). Estos compuestos se sintetizan de tal manera que ingresan a la célula por difusión a través de su membrana plasmática. Una vez dentro de la célula, el compuesto se modifica a una forma incapaz de salir de la célula. Con estas sondas puede medirse la concentración de iones de calcio libres en diferentes partes de la célula viva a lo largo del tiempo mediante la vigilancia de la luz emitida con un microscopio de fluorescencia y técnicas de imágenes por computadora. El uso de moléculas emisoras de luz sensibles al calcio ha permitido obtener imágenes sorprendentes de los complejos cambios espaciales y temporales en la concentración de calcio citosólico libre que ocurren en una sola célula como respuesta a varios tipos de estímulos. Esta es una de las ventajas de estudiar las respuestas mediadas por calcio en comparación con las respuestas mediadas por otros tipos de mensajeros cuya localización en la célula no es fácil de visualizar.

Según sea el tipo de célula que responde, un estímulo particular puede inducir oscilaciones repetidas de la concentración de iones libres de calcio, como se ve en la figura 15-9, o puede causar una oleada de liberación de Ca^{2+} que se extiende desde un extremo de la célula al otro (véase fig. 15-27) o iniciar una liberación localizada y transitoria de Ca^{2+} en una parte de la célula. La figura 15-25 muestra una célula de Purkinje, un tipo de neurona del cerebelo de los mamíferos que mantiene contacto sináptico con miles de células mediante una red elaborada de dendritas postsinápticas. La micrografía de la figura 15-25 muestra la liberación de calcio libre en una región localizada del "árbol" dendrítico de la célula después de la activación sináptica. El brote de liberación de calcio se limita a esta región de la célula.

Los receptores para IP_3 antes descritos son uno de los dos tipos principales de canales iónicos del Ca^{2+} presentes en la membrana del retículo endoplásmico; el otro tipo se llama *receptores para rianodina* (*RyR*) porque se unen con el alcaloide vegetal tóxico la rianodina. Los receptores para rianodina se hallan sobre todo en células excitables y se estudian mejor en las células de músculo esquelético y cardiaco, donde median el aumento de los niveles de Ca^{2+} después de la llegada de un potencial de acción. Las mutaciones en la isoforma cardiaca de RyR se han vinculado con la muerte súbita durante el ejercicio. Según sea el tipo de célula en el que se encuentren, los RyR pueden abrirse por diversos agentes, incluido el mismo calcio. El ingreso de una cantidad limitada de calcio por los canales abiertos en la membrana plasmática induce la abertura de receptores para la rianodina en el retículo endoplásmico, lo que induce la liberación de Ca^{2+} hacia el citosol (fig. 15-26). Este fenómeno se conoce como *liberación de calcio inducida por calcio* (*CICR*).

Las señales extracelulares que se transmiten por iones Ca^{2+} casi siempre actúan mediante la abertura de una pequeña cantidad de canales iónicos para Ca^{2+} en la superficie celular en el sitio del estímulo. A medida que los iones Ca^{2+} se apresuran por estos canales y entran al citosol, actúan sobre los canales iónicos cercanos para Ca^{2+} en el retículo endoplásmico, con lo que estos canales se abren y liberan más calcio hacia las regiones adyacentes del citosol. En algunas respuestas, la elevación de los niveles de Ca^{2+} se mantiene localizada en una pequeña región del citosol (como en la figura 15-25). En otros casos una ola propagada de liberación de calcio se disemina por todo el compartimiento citosólico. Una de las oleadas de Ca^{2+} más impresionantes ocurre en el minuto siguiente a la fecundación y se produce por el contacto del espermatozoide con la membrana plasmática del huevo (fig. 15-27). El incremento súbito de la concentración citoplásmica de calcio después de la fecundación inicia varios fenómenos, incluida la activación de cinasas dependientes de ciclina (pág. 574) que impulsan al cigoto a su primera

[2] Las mitocondrias también poseen una función relevante en el secuestro y liberación de iones Ca^{2+}, pero su papel aún no se comprende bien y no se trata en el texto.

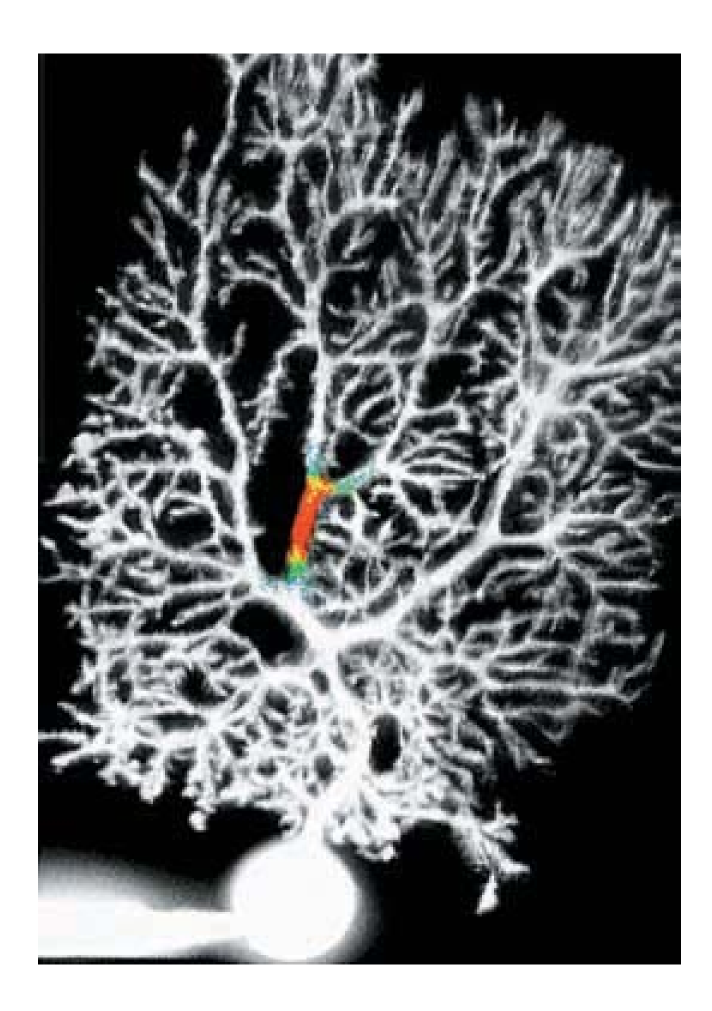


FIGURA 15-25 Demostración experimental de la liberación localizada de Ca^{2+} intracelular dentro de la dendrita de una neurona. El mecanismo de liberación de Ca^{2+} mediado por IP_3 de las reservas intracelulares se describe en la página 628. En esta micrografía que muestra una parte de una complejísima célula de Purkinje (neurona) del cerebelo se produjo una liberación local de iones calcio en una de las dendritas. La liberación de calcio (mostrada en rojo) se indujo en la dendrita después de la producción local de IP_3, la cual sigue a la activación repetitiva de una sinapsis cercana. Los sitios de liberación de iones Ca^{2+} se revelan por la fluorescencia de un indicador de calcio fluorescente que se cargó en la célula antes de la estimulación. (TOMADA DE ELIZABETH A. FINCH Y GEORGE J. AUGUSTINE. NATURE, VOL. 396, PORTADA DEL 24/12/1998; © 1998, MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)

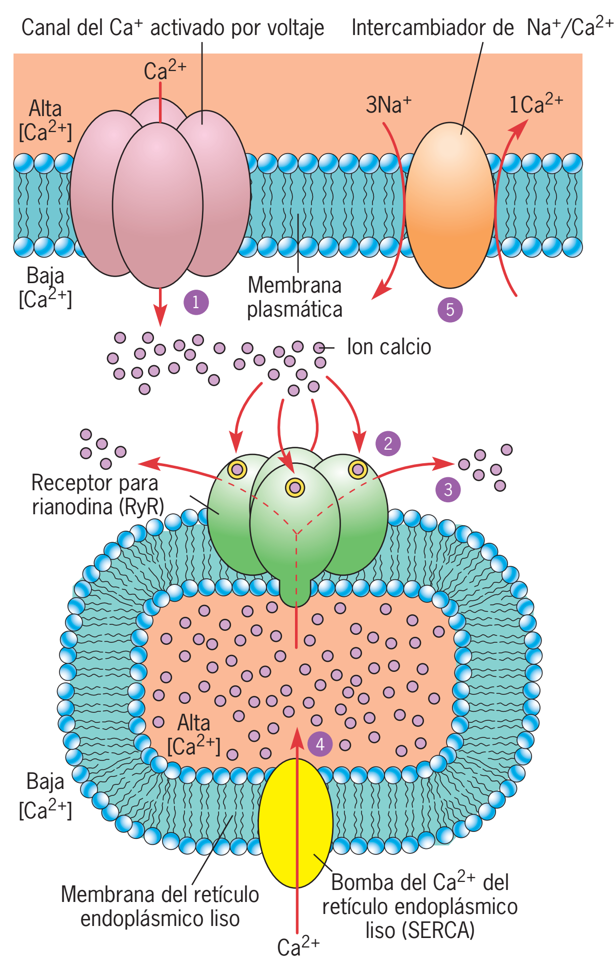


FIGURA 15-26 Liberación de calcio inducida por calcio, tal y como ocurre en las células excitables como el músculo cardiaco. La despolarización en el voltaje de la membrana produce la abertura de los canales del calcio activados por voltaje en la membrana plasmática, lo que permite la entrada de un escaso Ca^{2+} (paso 1) al citosol. Los iones calcio se unen con los RyR en la membrana del SER (paso 2), lo que induce la liberación del calcio almacenado en el citosol (paso 3), que inicia la contracción de la célula. Luego los iones calcio son retirados del citosol por acción de bombas del Ca^{2+} situadas en la membrana del SER (paso 4) y un sistema de transporte secundario de Na^{+}/Ca^{2+} en la membrana plasmática (paso 5), lo que causa la relajación. Este ciclo se repite después de cada latido cardiaco. (REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE M. J. BERRIDGE, NATURE 361:317, 1993; © 1993, MACMILLAN MAGAZINES LIMITED.)

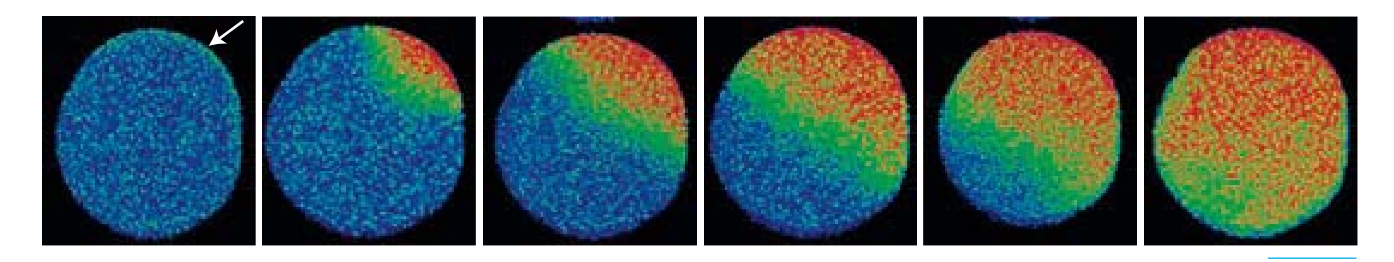


FIGURA 15-27 Oleada de calcio en un huevo de estrella de mar inducida por la fecundación con un espermatozoide. Se inyectó un pigmento fluorescente sensible al calcio en el huevo no fecundado, luego se fecundó y se fotografió a intervalos de 10 s. Se observa que el incremento de la concentración de calcio se extiende del punto de entrada del espermatozoide (flecha) a todo el huevo. El color azul se refiere a $[Ca^{2+}]$ libre baja, mientras que el color rojo a $[Ca^{2+}]$ libre alta. Una oleada similar de Ca^{2+} se produce en los huevos de los mamíferos mediante la formación de IP_3 por acción de una fosfolipasa C que introduce el espermatozoide al huevo durante la fecundación. (CORTESÍA DE STEPHEN A. STRICKER.)

división mitótica. Las oleadas de calcio son transitorias porque los iones se bombean con rapidez fuera del citosol y de regreso al retículo endoplásmico o al espacio extracelular.

Proteínas fijadoras de Ca^{2+} A diferencia del cAMP, cuya acción siempre está mediada por la estimulación de una cinasa de proteína, el calcio puede afectar a diferentes tipos de efectores celulares, incluidas las cinasas de proteína (cuadro 15-5). De acuerdo con el tipo celular, los iones de calcio pueden activar o inhibir varios sistemas enzimáticos y de transporte, cambiar la permeabilidad iónica de las membranas, inducir fusión de membranas o alterar la estructura y función del citoesqueleto. El calcio no precipita estas reacciones por sí mismo, sino que actúa junto con diversas **proteínas de unión con calcio** (los ejemplos se presentan en las páginas 306 y 374). La proteína de unión con calcio mejor conocida es la calmodulina, que participa en muchas vías de señalización.

La calmodulina se encuentra en todas las plantas, animales y microorganismos eucariotas y tiene la misma secuencia de aminoácidos de un extremo al otro del espectro eucariota. Cada molécula de calmodulina (fig. 15-28) posee cuatro sitios de unión para el calcio. La calmodulina no tiene afinidad suficiente por el Ca^{2+} para unirse al ion en una célula no estimulada. Sin embargo, si la concentración de Ca^{2+} se eleva como reacción a un estímulo, los iones se unen con la calmodulina y eso cambia la conformación de la proteína y aumenta su afinidad para varios efectores. Según sea el tipo celular, el complejo calcio-calmodulina (Ca^{2+}-CaM) puede unirse con una cinasa de proteína, una fosfodiesterasa de nucleótido cíclico, canales iónicos e incluso con el sistema de transporte de calcio de la membrana plasmática. En este último caso, los niveles crecientes de calcio activan el sistema encargado de liberar a la célula de cantidades excesivas del ion, lo que constituye un mecanismo de autorregulación para mantener las concentraciones intracelulares bajas de calcio. El complejo Ca^{2+}-CaM también puede estimular la transcripción génica mediante la activación de varias cinasas de proteína (CaMK) que fosforilan factores de transcripción. En el caso mejor estudiado, una de estas cinasas de proteína fosforila a CREB en el mismo residuo de serina que PKA (fig. 15-12).

Cuadro 15-2 Ejemplos de proteínas de mamíferos activadas por Ca^{2+}

Proteína	Función de la proteína
Troponina C	Modulador de la contracción muscular
Calmodulina	Modulador ubicuo de cinasa de proteínas y otras enzimas (MLCK, cinasa II de CaM, adenililciclasa I)
Calretinina, retinina	Activador de guanililciclasa
Calcineurina B	Fosfatasa
Calpaína	Proteasa
PLC específica para PI	Generador de IP_3 y diacilglicerol
Actinina alfa	Proteína agrupadora de actina
Anexina	Interviene en endocitosis y exocitosis, inhibición de PLA_2
Fosfolipasa A_2	Productor de ácido araquidónico
Cinasa de proteína C	Cinasa de proteína ubicua
Gelsolina	Proteína cortadora de actina
Receptor de IP_3	Efector de la liberación intracelular de Ca^{2+}
Receptor para rianodina	Efector de la liberación intracelular de Ca^{2+}
Intercambiador Na^+/Ca^{2+}	Efector del intercambio de Ca^{2+} por Na^+ a través de la membrana plasmática
ATPasa de Ca^{2+}	Bombea Ca^{2+} a través de las membranas
Antiportadores de Ca^{2+}	Intercambiador de Ca^{2+} por iones monovalentes
Caldesmón	Regulador de la contracción muscular
Vilina	Organizador de actina
Arrestina	Terminador de la reacción fotorreceptora
Calsecuestrina	Amortiguador de Ca^{2+}

Adaptado de D. E. Clapham, *Cell* 80:260, 1995; con autorización de los derechos reservados de Cell Press.

Regulación de las concentraciones de calcio en las células vegetales

Los iones calcio (que actúan en conjunto con la calmodulina) son mensajeros intracelulares importantes en las células vegetales. El nivel de calcio citosólico cambia en forma drástica en ciertas células vegetales como respuesta a diversos estímulos,

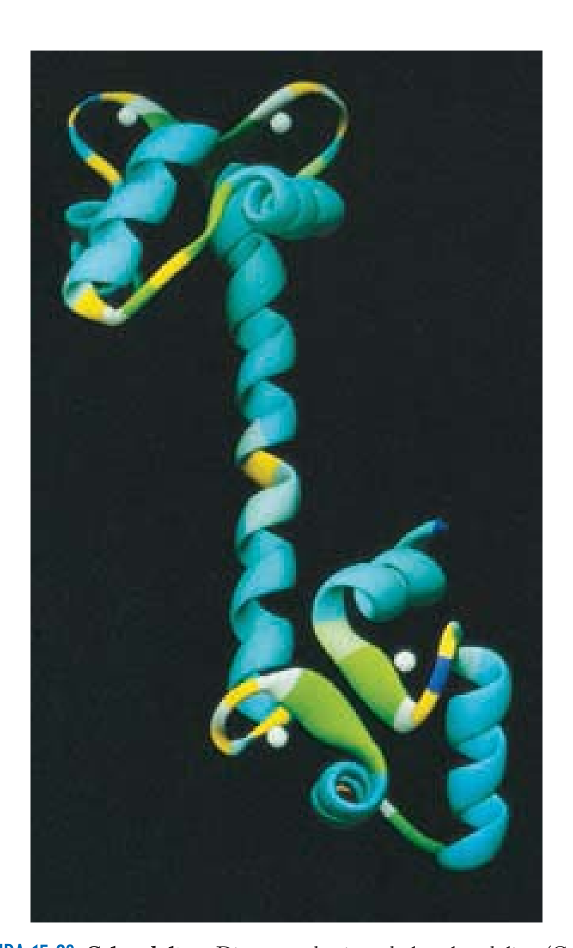
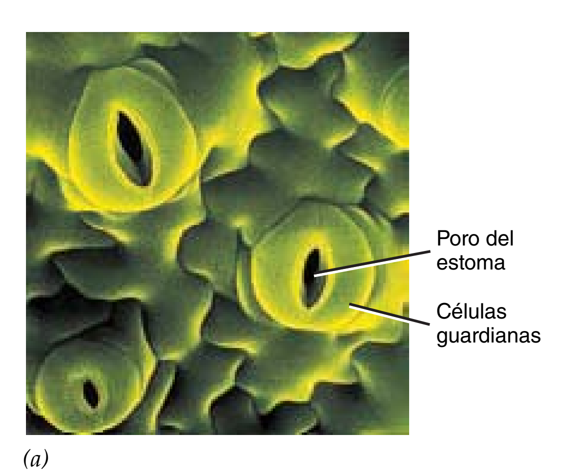
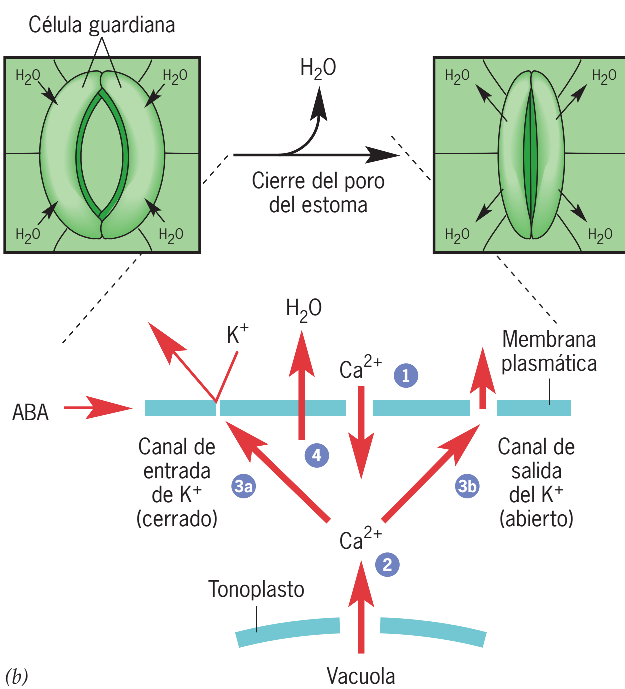


FIGURA 15-28 Calmodulina. Diagrama de cinta de la calmodulina (CaM) con cuatro iones calcio unidos (esferas blancas). La unión de estos iones Ca^{2+} cambia la conformación de la calmodulina y deja expuesta la superficie hidrófoba que promueve la interacción de Ca^{2+}-CaM con una gran cantidad de proteínas blanco. (CORTESÍA DE MICHAEL CARSON, UNIVERSITY OF ALABAMA EN BIRMINGHAM.)

incluidos cambios de la luz, presión, gravedad y la concentración de hormonas vegetales, como el ácido abscísico. La concentración de Ca^{2+} en el citosol de una célula vegetal en reposo se mantiene muy baja mediante la acción de proteínas de transporte situadas en la membrana plasmática y la membrana de las vacuolas (tonoplasto).



(a)



(b)

FIGURA 15-29 Modelo simplificado del papel del calcio en el cierre de la célula guardiana. *a*) Fotografía de los estomas, cada uno flanqueado por un par de células guardianas. Los estomas se mantienen abiertos mientras la presión de turgencia se conserva alta dentro de las células guardianas, lo que hace que se abulten hacia afuera como se advierte aquí. *b*) Uno de los factores que controla el tamaño de los poros es la hormona ácido abscísico (ABA). Cuando se elevan los niveles de ABA, se abren los canales iónicos para calcio de la membrana plasmática, lo que permite la entrada de Ca^{2+} (paso 1) y ello desencadena la liberación de Ca^{2+} de las reservas internas (paso 2). La elevación posterior de la concentración intracelular de calcio cierra los canales de entrada del K^+ (paso 3a) y abre los canales de salida del K^+ (paso 3b). La salida de potasio se acompaña de la de cloro. Estos movimientos iónicos producen una caída de la concentración interna de solutos y pérdida osmótica de agua (paso 4). (*A*, Jeremy Burgess/Photo Researchers.)

El papel del Ca^{2+} en la señalización de las células vegetales se ilustra en las células guardianas que regulan el diámetro de los poros microscópicos (estomas) de una hoja (fig. 15-29*a*). Los estomas son un sitio importante de pérdida de agua en las plantas (pág. 235) y el diámetro de su abertura está controlado de manera estricta, lo cual previene la desecación. El diámetro del estoma disminuye cuando decae la presión del líquido (turgencia) en la célula guardiana. A su vez, el descenso de la presión de turgencia se debe a la disminución de la concentración iónica (osmolaridad) de la célula guardiana. Las condiciones adversas, como las temperaturas elevadas y la humedad baja, estimulan la liberación de ácido abscísico, lo cual abre los canales del calcio en la membrana plasmática de la célula guardiana (fig. 15-29*b*). La entrada resultante de Ca^{2+} al citosol activa la liberación de más Ca^{2+} de las reservas intracelulares. La concentración alta de Ca^{2+} citosólico induce el cierre de los canales de entrada del K^+ en la membrana plasmática y la abertura de los canales de salida del K^+. Estos cambios producen una salida neta de iones K^+ (y de iones Cl^- que los acompañan) con descenso de la presión de turgencia.

REVISIÓN ?

1. ¿Cómo se mantiene la $[Ca^{2+}]$ del citosol en un nivel tan bajo?, ¿cómo cambia la concentración en respuesta a los estímulos?
2. ¿Cuál es el papel de las proteínas de unión con calcio como la calmodulina en la inducción de una respuesta?
3. Describa el papel del calcio en la mediación del diámetro de los estomas en las células guardianas.

15.6 CONVERGENCIA, DIVERGENCIA Y COMUNICACIÓN CRUZADA ENTRE DIFERENTES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

Las vías de señalización antes descritas, e ilustradas de manera esquemática en las diversas figuras, muestran vías lineales que conducen de manera directa a un receptor en la superficie celular a un blanco final. En realidad, las vías de señalización de la célula son mucho más complejas. Por ejemplo:

- Las señales de diversos receptores no relacionados, cada uno unido con su propio ligando, pueden *converger* para activar un efector común, como Ras o Raf.
- Las señales del mismo ligando, como EGF o insulina, pueden *divergir* para activar varios efectores distintos, lo que conduce a diversas respuestas celulares.
- Las señales pueden ir y venir entre diferentes vías, un fenómeno conocido como *comunicación cruzada*.

Estas características de las vías de señalización celular se ilustran en el esquema de la figura 15-30.

Las vías de señalización proporcionan un mecanismo para dirigir la información a través de una célula, algo similar a la manera en que el sistema nervioso central dirige la información hacia los diferentes órganos del cuerpo y de regreso. Del mismo modo el sistema nervioso central reúne información sobre

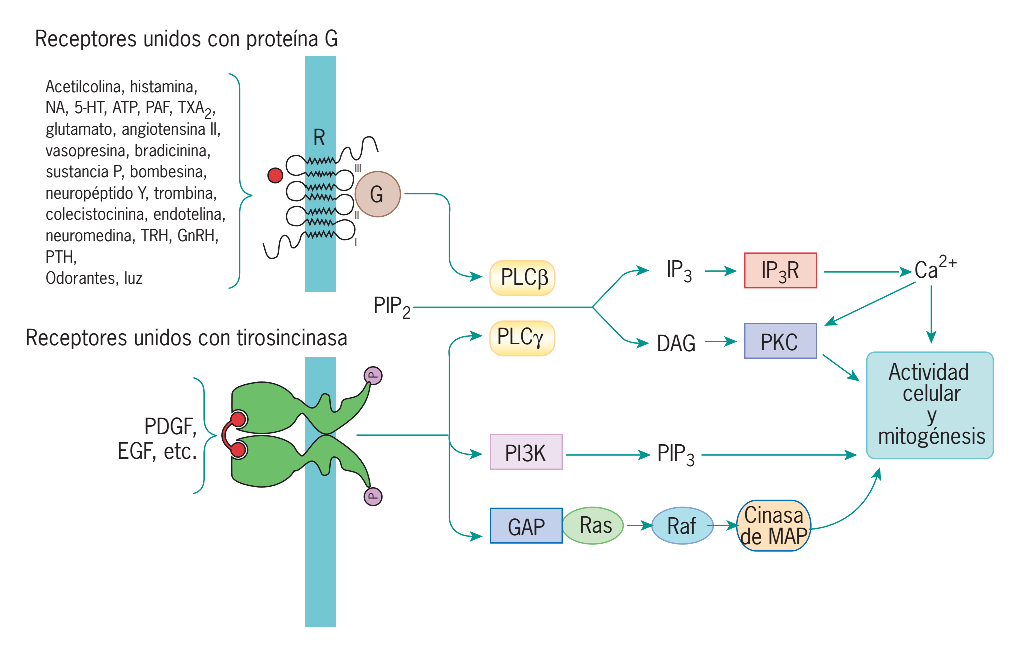


FIGURA 15-30 Ejemplos de convergencia, divergencia y comunicación cruzada entre varias vías de transducción de señales. Este dibujo muestra los esbozos de las vías de transducción de señales iniciadas por receptores que actúan mediante proteínas G heterotriméricas y proteintirosincinasas receptoras. Se observa que las dos convergen por la activación de diferentes isoformas de fosfolipasa C y ambas conducen a la producción de los mismos segundos mensajeros (IP_3 y DAG). La activación de RTK por PDGF o EGF da lugar a la transmisión de señales por tres vías diferentes, un ejemplo de divergencia. La comunicación cruzada entre los dos tipos de vías la ilustran los iones de calcio, los cuales se liberan del retículo endoplásmico liso por la acción de IP_3 y luego pueden actuar sobre varias proteínas, incluida la cinasa de proteína C (PKC), cuya actividad también se estimula por DAG. (Tomada de M. J. Berridge, reimpresa con autorización de Nature vol. 361, p. 315, 1993. © 1993, Macmillan Journals Limited.)

el ambiente a partir de varios órganos sensitivos, la célula recibe información sobre su ambiente mediante la activación de varios receptores de superficie, los cuales actúan como sensores para detectar los estímulos extracelulares. Al igual que los órganos de los sentidos son sensibles a ciertas formas de estímulos (p. ej., luz, presión u ondas sonoras), los receptores de la superficie celular pueden unirse sólo con ligandos específicos y no se afectan por la presencia de una gran variedad de moléculas sin relación. Una sola célula puede tener docenas de receptores distintos que emiten señales hacia el interior de la célula al mismo tiempo. Una vez que se interiorizan en la célula, las señales de estos receptores pueden derivarse en forma selectiva por muchas vías de señalización diferentes que pueden hacer que la célula se divida, cambie de forma, active una vía metabólica particular e incluso cometa suicidio (se describe en la siguiente sección). De esta manera, la célula incorpora la información que le llega de distintas fuentes y establece una respuesta integral apropiada.

Ejemplos de convergencia, divergencia y comunicación cruzada entre vías de señalización

1. ***Convergencia.*** En este capítulo ya se han descrito dos tipos distintos de receptores de la superficie celular: receptores unidos con proteína G y tirosincinasas receptoras. Otro tipo de receptor de la superficie celular con capacidad para transducción de señales se describe en el capítulo 7, las integrinas. Aunque estos tres tipos de receptores pueden unirse con ligandos muy distintos, todos ellos pueden conducir a la formación de sitios de acoplamiento con fosfotirosina para el dominio SH2 de la proteína adaptadora Grb2 muy próximos a la membrana plasmática (fig. 15-31). El reclutamiento de complejos Grb2-Sos conduce a la activación de Ras y la transmisión de señales por la vía de la cinasa de MAP. Como resultado de esta convergencia, las señales de los diversos receptores pueden conducir a la transcripción y traducción de un conjunto similar de genes promotores del crecimiento en cada célula blanco.
2. ***Divergencia.*** La evidencia de divergencia de la señal existe en todos los ejemplos de transducción de señal que se han descrito en este capítulo. Revise las figuras 15-13 y 15-23*b*, *c* en las que se ilustra cómo un solo estímulo (un ligando que se une con un GPCR o un receptor para insulina) emite señales por una gran variedad de vías distintas.
3. ***Comunicación cruzada.*** En las secciones previas se examinaron varias vías de señalización como si cada una fuera una cadena de fenómenos independiente y lineal. De hecho, los circuitos de información que operan en la célula se parecen más a una red interconectada en la que los componentes producidos en una vía pueden participar en fenómenos que ocurren en otras vías. Mientras más se aprende sobre la señalización en las células se descubren más comunicaciones cruzadas entre las vías de señalización. En lugar de intentar catalogar éstas las maneras en que la información puede ir y

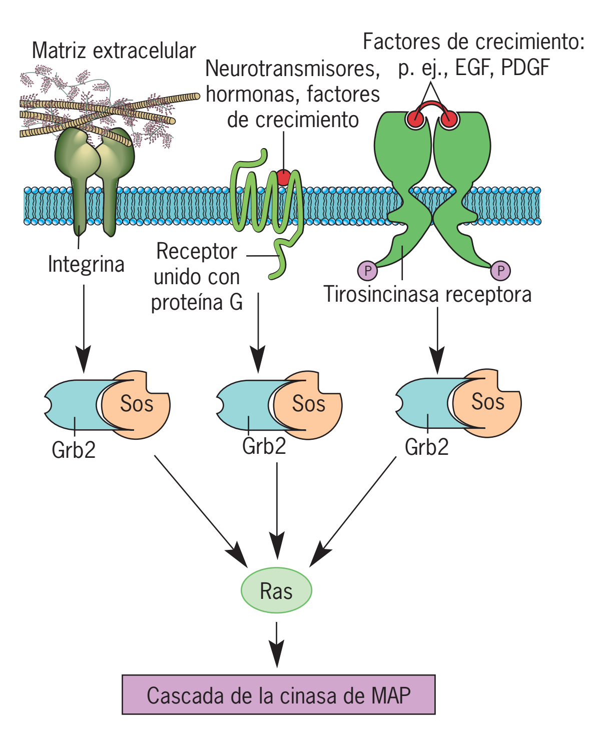


FIGURA 15-31 Las señales transmitidas de un receptor unido con proteína G, una integrina y una tirosincinasa receptora convergen en Ras y luego se transmiten a lo largo de la cascada de cinasa de MAP.

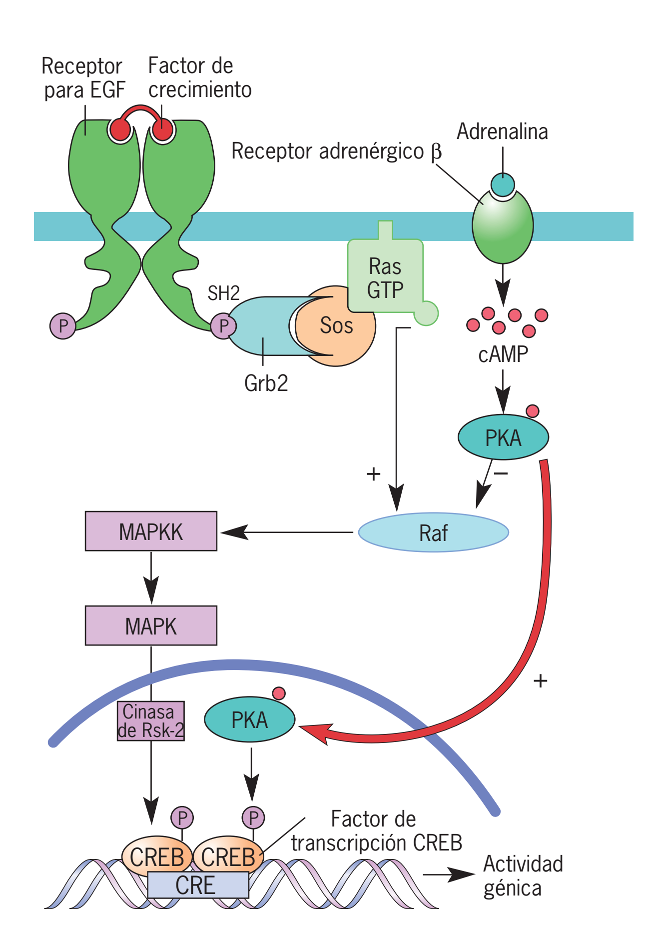


FIGURA 15-32 Un ejemplo de comunicación cruzada entre dos vías principales de señalización. El AMP cíclico actúa en algunas células mediante la cinasa PKA dependiente de cAMP para bloquear la transmisión de señales de Ras a Raf, la cual inhibe la activación de la cascada de cinasa de MAP. Además, la PKA y las cinasas de la cascada de cinasa de MAP fosforilan al factor de transcripción CREB en el mismo residuo de serina, lo que activa al factor de transcripción y permite que se una con sitios específicos del DNA.

venir dentro de una célula, se presenta un ejemplo en el que interviene el cAMP e ilustra la importancia de este tipo de comunicación cruzada.

Ya se presentó al AMP cíclico como el iniciador de una cascada de reacciones que conduce a la movilización de glucosa. Sin embargo, el cAMP también puede inhibir el crecimiento de diversas células, como los fibroblastos y las células adiposas, mediante el bloqueo de las señales transmitidas por la cascada de la cinasa de MAP. Se cree que el AMP cíclico realiza esta tarea mediante la activación de PKA, la cinasa dependiente de cAMP que puede fosforilar e inhibir a Raf, la proteína que encabeza la cascada de la cinasa de MAP (fig. 15-32). Estas dos vías también se intersecan con otro efector importante de la señalización, el factor de transcripción CREB. CREB se describió en la página 631 como un efector terminal de las vías mediadas por cAMP. Durante años se asumió que a CREB sólo podía fosforilarlo la cinasa dependiente de cAMP, la PKA. En los últimos años se tornó evidente que CREB es sustrato de una variedad mucho más amplia de cinasas. Por ejemplo, una de las cinasas que fosforila a CREB es Rsk-2, que es sustrato de MAPK de la vía de la cinasa de MAP (fig. 15-32). En realidad, tanto PKA como Rsk-2 fosforilan a CREB en el mismo residuo de aminoácido, Ser133, lo que puede dotar al factor de transcripción del mismo potencial en ambas vías.

En estos ejemplos de convergencia, divergencia y comunicación cruzada surge una pregunta importante aún sin responder: ¿de qué manera los distintos estímulos pueden inducir reacciones diferentes, incluso si utilizan vías similares? Por ejemplo, PI3K es una enzima que se activa por muchos estímulos diversos, entre ellos la adhesión celular a la matriz extracelular, insulina y EGF. ¿Cómo la activación de PI3K en una célula hepática estimulada por la insulina promueve la síntesis de proteína, mientras que la activación de PI3K en una célula epitelial adherente promueve la supervivencia celular? Al final, estas respuestas celulares contrastantes deben ser resultado de diferencias en la composición proteica de los diferentes tipos celulares. Es probable que parte de la respuesta radique en el hecho de que distintas células tienen diferentes versiones (isoformas) de estas proteínas, incluida PI3K. Algunas de estas isoformas se codifican en genes distintos, pero relacionados, mientras que otras se generan por empalme alternativo (pág. 531) u otros mecanismos. Por ejemplo, las distintas isoformas de PI3K, PKB o PLC pueden unirse

con distintos conjuntos de componentes en ambos sentidos de la vía, lo cual permitiría que vías similares indujeran reacciones diferentes. No obstante, no es probable que la variación de la isoforma explique la extraordinaria diversidad de respuestas celulares mucho mejor que las diferencias en las estructuras de las neuronas pueden explicar el espectro de respuestas suscitadas por el sistema nervioso. Es deseable que, cuando se describan las vías de señalización de más y más células, se comprenda mejor la especificidad que puede alcanzarse con el uso de moléculas similares de señalización.

15.7 LA FUNCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO COMO MENSAJERO INTERCELULAR

Durante el decenio de 1980 se descubrió un tipo nuevo de segundo mensajero que no era un compuesto orgánico, como el cAMP, ni un ion, como el Ca^{2+}; se trataba de un gas inorgánico, el óxido nítrico (NO). Este compuesto es inusual porque actúa como un mensajero extracelular, mediando la comunicación intercelular, y como un segundo mensajero, dentro de la célula en la cual se genera. El NO se forma a partir del aminoácido L-arginina en una reacción que requiere oxígeno y NADPH y que es catalizada por la enzima sintetasa del óxido nítrico (NOS). Desde su descubrimiento se ha hecho evidente que el NO interviene en una miríada de procesos biológicos incluidos anticoagulación, neurotransmisión, relajación del músculo liso y percepción visual.

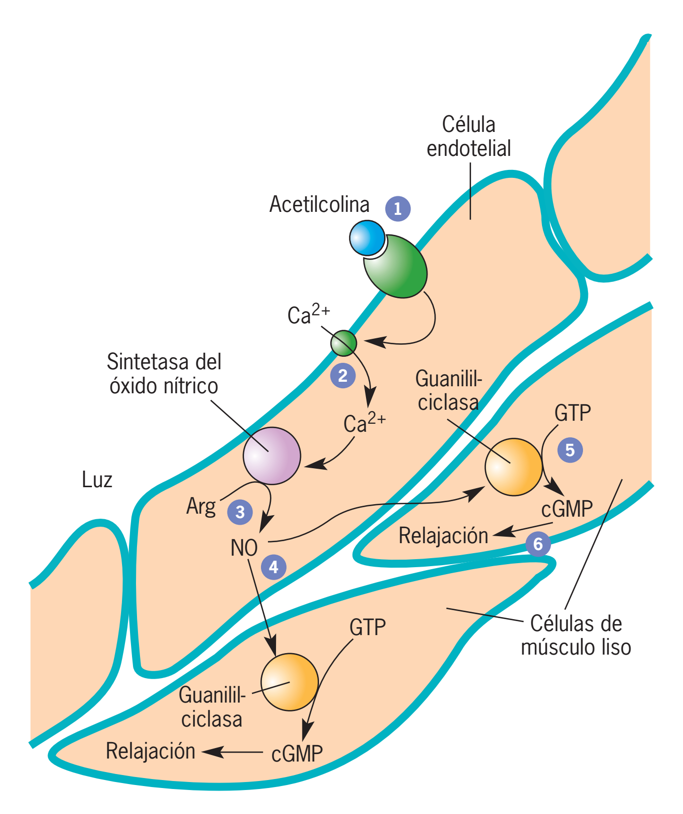


FIGURA 15-33 Una vía de transducción de señal que opera mediante el NO y el GMP cíclico y produce dilatación de los vasos sanguíneos. Los pasos ilustrados en la figura se describen en el texto. (Tomada de R. G. Knowles y S. Moncada, Trends Biochem Sci 17:401, 1992.)

Como sucede con muchos fenómenos biológicos, el descubrimiento de que el NO funciona como segundo mensajero se originó en una observación accidental. Durante muchos años se había sabido que la acetilcolina actúa en el cuerpo para relajar las células de músculo liso de los vasos sanguíneos, pero la respuesta no pudo duplicarse *in vitro.* Cuando se incubaban in vitro porciones de grandes vasos sanguíneos, como la aorta, con concentraciones fisiológicas de acetilcolina, la preparación mostraba poca o nula reacción. A final del decenio de 1970, Robert Furchgott, un farmacólogo del *New York State Medical Center*, estudiaba la respuesta in vitro de fragmentos de aorta de conejo a varios agentes. En este estudio inicial, Furchgott utilizó tiras de aorta que se habían disecado del órgano. Por razones técnicas, Furchgott cambió de tiras de tejido aórtico a anillos aórticos y descubrió que las nuevas preparaciones reaccionaban a la acetilcolina con relajación. La investigación adicional reveló que las tiras no mostraban la respuesta de relajación porque la capa endotelial delicada que recubre la aorta se había desprendido durante la disección. Este hallazgo sorprendente sugirió que las células endoteliales participaban de alguna manera en la reacción de las células musculares adyacentes. En los estudios siguientes se encontró que la acetilcolina se une con los receptores en la superficie de las células endoteliales, lo que conduce a la producción y liberación de un agente que se difunde por la membrana plasmática de la célula y hace que las células musculares se relajen. En 1986, Louis Ignarro de la *UCLA* y Salvador Moncada de los *Wellcome Research Labs* en Inglaterra identificaron que el agente con capacidad de difusión era el óxido nítrico. Los pasos en la respuesta de relajación inducida por acetilcolina se ilustran en la figura 15-33.

La unión de acetilcolina a la superficie externa de una célula endotelial (paso 1, fig. 15-33) representa una señal para el aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+} (paso 2) que activa a la sintetasa de óxido nítrico (paso 3). El NO formado en la célula endotelial se difunde por la membrana plasmática y hacia las células adyacentes de músculo liso (paso 4), donde se une y estimula a la guanililciclasa (paso 5), la enzima que sintetiza el GMP cíclico (cGMP), que es un segundo mensajero importante de estructura similar al cAMP. El GMP cíclico causa un descenso de la concentración citosólica de Ca^{2+}, lo que induce la relajación de la célula muscular (paso 6) y dilatación del vaso sanguíneo.

NO como activador de la guanililciclasa El descubrimiento de que el NO actúa como activador de la guanililciclasa lo hicieron Ferid Murad y sus colegas a finales del decenio de 1970 en la *University of Virginia.* Murad trabajaba con “azida” (N_3), un inhibidor potente del transporte de electrones, y por casualidad descubrió que la molécula estimulaba la producción de cGMP en extractos celulares. Al final, Murad y sus colegas demostraron que la “azida” se convertía por medios enzimáticos en óxido nítrico, el cual era el activador real de la guanililciclasa. Estos estudios también explicaron la acción de la nitroglicerina, que se había usado desde el decenio de 1860 para tratar el dolor anginoso que se produce por el flujo sanguíneo insuficiente al corazón. La nitroglicerina se metaboliza hasta óxido nítrico, el cual estimula la relajación del músculo liso que recubre los vasos

sanguíneos del corazón, lo que incrementa el flujo sanguíneo en el órgano. Los beneficios terapéuticos de la nitroglicerina se descubrieron mediante una observación interesante. Las personas con cardiopatía que trabajaban con nitroglicerina en la fábrica de dinamita de Alfred Nobel sufrían más la angina los días que no iban a trabajar. Fue apropiado que el premio Nobel, que se fundó con una donación de Alfred Nobel, se otorgara en 1998 por el descubrimiento del NO como agente de señalización.

Inhibición de fosfodiesterasa El descubrimiento del NO como segundo mensajero también condujo al desarrollo del sildenafilo. Durante la excitación sexual, las terminaciones nerviosas del pene liberan NO, el cual produce la relajación de las células musculares lisas en el recubrimiento de los vasos sanguíneos penianos e ingurgitación del órgano con sangre. Como se describió antes, el NO media esta respuesta en las células del músculo liso con la activación de la enzima guanililciclasa y la síntesis posterior de cGMP. El sildenafilo (y fármacos afines) no tiene efecto en la liberación de NO ni en la activación de la guanililciclasa, sino que actúa como inhibidor de la fosfodiesterasa de cGMP, la enzima que destruye al cGMP. La inhibición de esta enzima lleva al mantenimiento de los niveles elevados de cGMP, lo que promueve el desarrollo y mantenimiento de la erección. El sildenafilo es muy específico para una isoforma particular de la fosfodiesterasa de cGMP, PDE5, que es la versión que actúa en el pene. Otra isoforma de la enzima, PDE3, tiene una función clave en la regulación de la contracción del músculo cardiaco, pero por fortuna no se inhibe con el medicamento. El sildenafilo se descubrió cuando un posible medicamento antianginoso tuvo efectos secundarios inesperados.

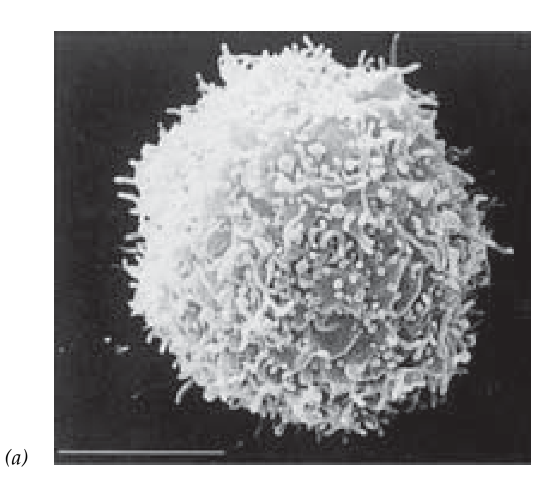
La investigación reciente reveló que el NO posee varias acciones en el cuerpo que no implican la producción de cGMP. Por ejemplo, el NO se agrega al grupo —SH de ciertos residuos de cisteína en diversas proteínas, incluidos la hemoglobina, Ras, canales de rianodina y caspasas. Esta modificación posterior a la traducción, llamada *S-nitrosilación*, altera la actividad o propiedades de la proteína.

REVISIÓN ?

1. Describa los pasos de la vía de señalización mediante la cual el óxido nítrico media la dilatación de los vasos sanguíneos.

15.8 APOPTOSIS (MUERTE CELULAR PROGRAMADA)

La **apoptosis**, o muerte celular programada, es un hecho normal en el que una secuencia organizada de fenómenos conduce a la muerte de la célula. La muerte por apoptosis es un proceso limpio y ordenado (fig. 15-34) caracterizado por el


(a)

(b)

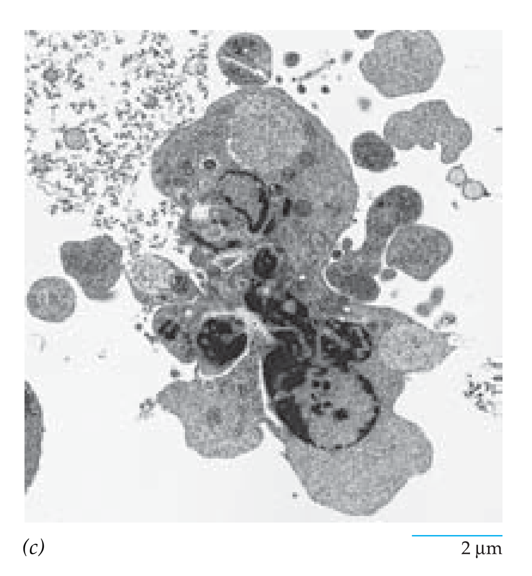

(c)

FIGURA 15-34 Comparación de una célula normal y células apoptósicas. *a* y *b*) micrografías electrónicas de barrido de una célula normal (*a*) y una célula apoptósica (*b*) de un hibridoma de células T. La célula que se somete a apoptosis tiene muchas vesículas superficiales que se desprenden de la célula. La barra equivale a 4 μm. *c*) Micrografía electrónica de transmisión de una célula apoptósica tratada con un inhibidor que detiene la apoptosis en la etapa de vesículas de membrana. (*A* Y *B*, TOMADAS DE Y. SHI Y D. R. GREEN, EN S. J. MARTIN ET AL., TRENDS BIOCHEM SCI 19:28, 1994; *C*, CORTESÍA DE NICOLA J. MCCARTHY.)

encogimiento general del volumen de la célula y su núcleo, pérdida de adhesión a las células contiguas, formación de vesículas en la superficie celular, disección de la cromatina en pequeños fragmentos y englobamiento rápido del "cadáver" por fagocitosis.

¿Por qué el cuerpo tiene células indeseables y dónde se encuentran las células que están marcadas para la eliminación? La respuesta sintética es la siguiente: en casi cualquier parte donde se busque. Se ha estimado que en el cuerpo humano cada día mueren 10^{10} a 10^{11} células por apoptosis. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario las neuronas crecen a partir del sistema nervioso central para inervar órganos que se encuentran en la periferia del cuerpo. Por lo general, crecen muchas más neuronas de las necesarias para la inervación normal. Las neuronas que llegan a su destino reciben una señal del tejido blanco que les permite sobrevivir. Las neuronas que no encuentran el camino hasta el tejido blanco no reciben la señal de supervivencia y al final se eliminan por apoptosis. Los linfocitos T son células del sistema inmunológico, que reconocen y destruyen a las células blanco anormales o infectadas con patógenos. Estas células blanco se reconocen por receptores específicos que se encuentran en la superficie de los linfocitos T. Durante el desarrollo embrionario se producen linfocitos T que tienen receptores capaces de unirse con firmeza a las proteínas presentes en la superficie de las células normales dentro del cuerpo. Los linfocitos T que tienen esta peligrosa capacidad se eliminan por apoptosis (véase fig. 17-24). La apoptosis también participa en la eliminación de células que sufrieron daño genómico irreparable. Esto es importante porque el daño a la copia genética puede derivar en la división celular no regulada y desarrollo de cáncer. Por último, la apoptosis parece participar en enfermedades neurodegenerativas como las de Alzheimer, Parkinson y Huntington. La eliminación de neuronas esenciales durante la progresión de la afección conduce a la pérdida de memoria o la coordinación motora. Estos ejemplos muestran que la apoptosis es importante para mantener la homeostasis en los organismos multicelulares y que la falla de la regulación de la apoptosis puede ocasionar daños graves al organismo.

John Kerr, Andrew Wyllie y A. R. Currie de la *Aberdeen University* en Escocia acuñaron el término "apoptosis" en 1972, en un documento trascendental que describía por primera vez los fenómenos coordinados que ocurrían durante la muerte programada de una gran variedad de células. La información sobre la base molecular de la apoptosis se reveló por primera vez en los estudios con el gusano nematodo *C. elegans*, cuyas células pueden seguirse con absoluta precisión durante el desarrollo embrionario. De las 1 090 células producidas durante el desarrollo de este gusano, 131 se destinaban a morir por apoptosis. En 1986, Robert Horvitz y sus colegas del *Massachusetts Institute of Technology* descubrieron que los gusanos que tenían una mutación en el gen *CED-3* continuaban con el desarrollo sin perder ninguna de sus células por apoptosis. Este hallazgo sugirió que el producto del gen *CED-3* tenía un papel crucial en el proceso de la apoptosis en este organismo. Una vez que se identificó el gen en un organismo, como un nematodo, los investigadores pueden buscar genes homólogos en otros organismos, como los seres humanos u otros mamíferos. La identificación del gen *CED-3* en los nematodos condujo al descubrimiento de una familia homóloga de proteínas en los mamíferos, que ahora se llaman **caspasas**. Las caspasas son un grupo distintivo de proteasas de cisteína (proteasas con un residuo clave de cisteína en su sitio catalítico) que se activan en una etapa temprana de la apoptosis y desencadenan la mayoría o todos los cambios observados durante la muerte celular. Las caspasas realizan esta tarea mediante la división de un grupo selecto de proteínas esenciales. Entre los blancos de las caspasas figuran los siguientes:

- *Más de una docena de cinasas de proteína, incluida la cinasa de adhesión focal (FAK), PKB, PKC y Raf1*. Por ejemplo, se presupone que la inactivación de FAK interrumpe la adhesión celular, con lo que se desprende la célula apoptósica de sus vecinas.
- *Láminas*, que constituyen el recubrimiento interno de la envoltura nuclear. La separación de las láminas conduce al desensamble de la lámina nuclear y al encogimiento del núcleo.
- *Proteínas del citoesqueleto*, como las de los filamentos intermedios, actina, tubulina y gelsolina. La división y desactivación consecuente de estas proteínas produce cambios en la forma celular.
- *Una endonucleasa conocida como DNasa activada por caspasa (CAD)*, que se activa después que la caspasa divide una proteína inhibidora. Una vez activada, la CAD se traslada del citoplasma al núcleo, donde ataca al DNA y lo parte en fragmentos.

Estudios recientes se han enfocado en los fenómenos que conducen a la activación de un programa suicida en la célula. La apoptosis puede iniciarse por estímulos internos, como anormalidades en el DNA, y externos, como determinadas citocinas (proteínas secretadas por células del sistema inmunitario). Por ejemplo, las células epiteliales de la próstata sufren apoptosis cuando se les priva de la hormona sexual masculina testosterona. Esta es la razón por la que el cáncer prostático que se diseminó a otros tejidos a menudo se trata con fármacos que interfieren con la producción de testosterona. Los estudios indican que los estímulos externos activan la apoptosis mediante una vía de señalización llamada *vía extrínseca*, que se distingue de la utilizada por los estímulos internos, denominada *vía intrínseca.* Aquí se analizarán las vías extrínseca e intrínseca por separado. Sin embargo, debe hacerse notar que existe comunicación cruzada entre estas vías y que señales apoptósicas extracelulares pueden causar la activación de la vía intrínseca.

La vía extrínseca de la apoptosis

Los pasos de la vía extrínseca se ilustran en la figura 15-35. En el caso mostrado en esta figura, el estímulo para la apoptosis lo porta una proteína mensajera extracelular llamada factor de necrosis tumoral (TNF), que recibe este nombre por su capacidad para destruir células tumorales. El TNF se produce en ciertas células del sistema inmunitario como respuesta a factores adversos, como la exposición a radiación ionizante, temperatura elevada, infección vírica o sustancias tóxicas como las empleadas en la quimioterapia contra el cáncer. Al igual que otros tipos de primeros mensajeros descritos en este capítulo, el TNF induce su reacción mediante la unión con un receptor transmembranoso, TNFR1. Éste es miembro de una familia de "receptores de muerte" relacionados que median la apoptosis. La eviden-

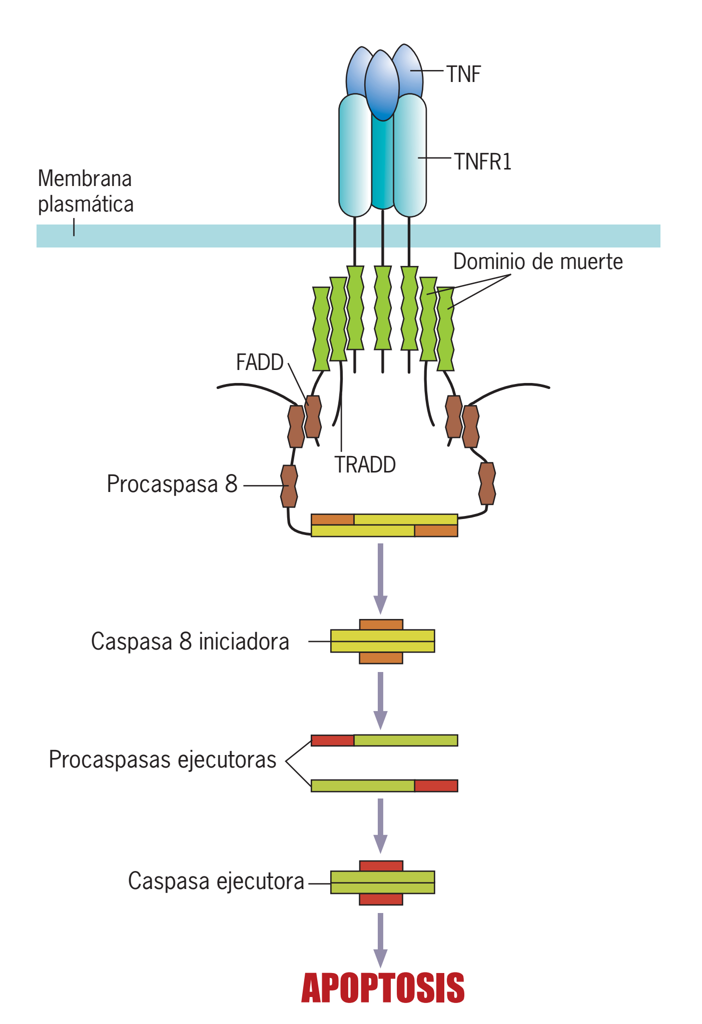


FIGURA 15-35 La vía extrínseca (mediada por receptor) de la apoptosis. Cuando el TNF se une con un receptor para TNF (TNFR1), el receptor activado se une con dos proteínas adaptadoras citoplásmicas diferentes (TRADD y FADD) y la procaspasa 8 para formar un complejo multiproteico en la superficie interna de la membrana plasmática. Los dominios citoplásmicos del receptor TNF, FADD y TRADD interactúan entre sí mediante regiones homólogas llamadas dominios de muerte que se encuentran en cada proteína (indicados como cuadros verdes). La procaspasa 8 y FADD interactúan mediante regiones homólogas llamadas dominios efectores de muerte (indicadas como cuadros cafés). Una vez ensambladas en el complejo, las dos moléculas de procaspasa se dividen una a la otra para generar una molécula activa de caspasa 8 que contiene cuatro segmentos polipeptídicos. La caspasa 8 es un complejo iniciador que divide a las caspasas corriente abajo (ejecutoras) que perpetran la sentencia de muerte. Puede notarse que la interacción entre TNF y TNFR1 también activa otras vías de señalización, una de las cuales conduce a la supervivencia celular en lugar de la autodestrucción.

cia disponible sugiere que el receptor para TNF se encuentra en la membrana plasmática como un trímero ya ensamblado. El dominio citoplásmico de cada subunidad del receptor para TNF contiene un segmento de unos 70 aminoácidos llamado "dominio de muerte" (cada segmento verde de la figura 15-35) que media las interacciones entre proteínas. La unión del TNF al receptor trimérico produce un cambio en la conformación del dominio de muerte del receptor que conduce al reclutamiento de varias proteínas, como se indica en la figura 15-35.

Las últimas proteínas en unirse al complejo que se ensambla en la superficie interna de la membrana plasmática son dos moléculas de procaspasa 8 (fig. 15-35). Estas proteínas se llaman "procaspasas" porque cada una es precursora de una caspasa; contienen una porción adicional que debe eliminarse mediante procesamiento proteolítico para activar la enzima. La síntesis de las caspasas como proenzimas protege a la célula del daño proteolítico accidental. A diferencia de la mayoría de las proenzimas, las procaspasas tienen un nivel bajo de actividad proteolítica. Conforme a un modelo, cuando dos o más procaspasas se mantienen muy próximas unas con otras, como se encuentran en la figura 15-35, son capaces de dividir sus cadenas polipeptídicas entre sí y convertir a la molécula en una caspasa activa. La enzima madura final (caspasa 8) posee cuatro cadenas polipeptídicas derivadas de dos precursores procaspasa como lo muestra la figura.

En principio, la activación de la caspasa 8 es similar a la activación de los efectores por acción de una hormona o factor de crecimiento. En todas estas vías de señalización, la unión de un ligando extracelular crea un cambio en la conformación de un receptor que lleva a la unión y activación de proteínas situadas corriente abajo en la vía. La caspasa 8 se describe como una caspasa *iniciadora* porque comienza la apoptosis mediante la división y activación corriente abajo, o como caspasas ejecutoras porque realizan la autodestrucción controlada de la célula, como se describió antes.

La vía intrínseca de la apoptosis

Los estímulos internos, como el daño genético irreparable, las concentraciones demasiado elevadas de Ca^{2+} en el citosol o el estrés oxidativo grave (esto es, la producción de grandes cantidades de radicales libres destructivos, página 34) y la falta de señales de supervivencia (ausencia de factores de crecimiento) desencadenan la apoptosis por la vía intrínseca ilustrada en la figura 15-36. Miembros de la familia Bcl-2 de proteínas regulan la activación de la vía intrínseca. Los integrantes de la familia Bcl-2 pueden subdividirse en dos grupos, los miembros proapoptósicos que promueven la apoptosis (p. ej., Bad y Bax) y los miembros antiapoptósicos que protegen a las células de la apoptosis (p. ej., Bcl-x_L, Bcl-w y Bcl-2). La Bcl-2 misma se identificó originalmente en 1985 como un oncogén causante de tumores. Ahora se comprende que actúa como un oncogén mediante la promoción de la supervivencia de células cancerosas potenciales que de lo contrario morirían.

En la vía intrínseca mostrada en la figura 15-36, los estímulos estresantes, como los descritos antes, activan ciertos miembros proapoptósicos de la familia Bcl-2, como Bax, que se trasladan del citosol a la membrana mitocondrial externa. La unión de Bax a la membrana mitocondrial externa aumenta la permeabilidad de esta membrana y promueve la liberación de ciertas proteínas mitocondriales, en especial citocromo *c* (fig. 15-37), que se encuentran en el espacio intermembranoso (véase fig. 5-17). La evidencia actual señala que Bax (o Bak, o ambas) forma un canal recubierto de proteína dentro de la membrana mitocondrial. La permeabilidad de la membrana mitocondrial puede ser acelerada por un aumento en las concentraciones citosólicas de Ca^{2+}

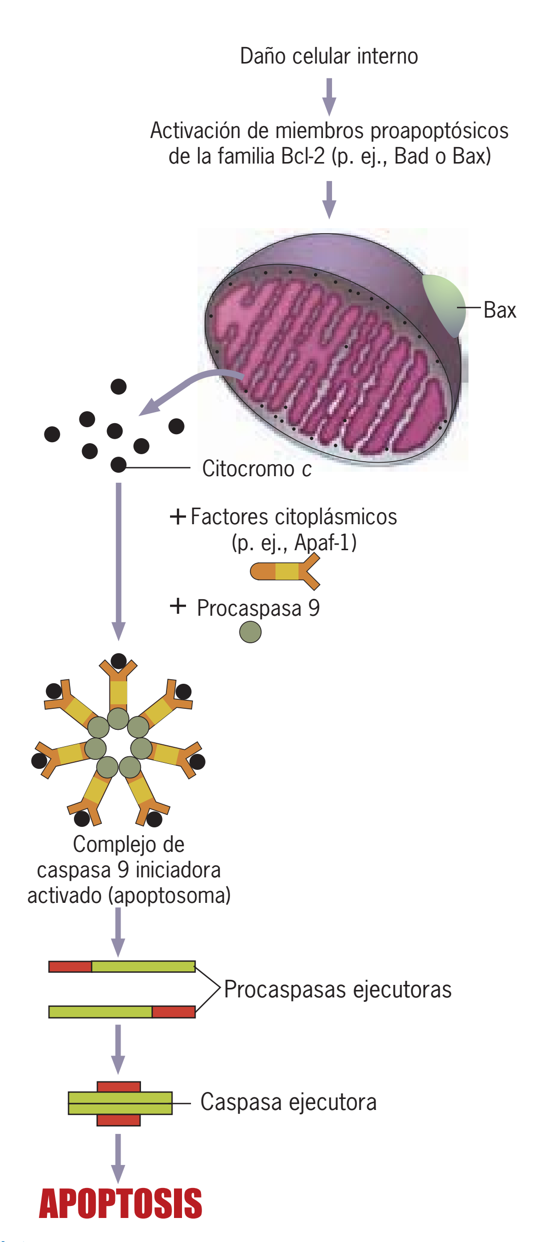
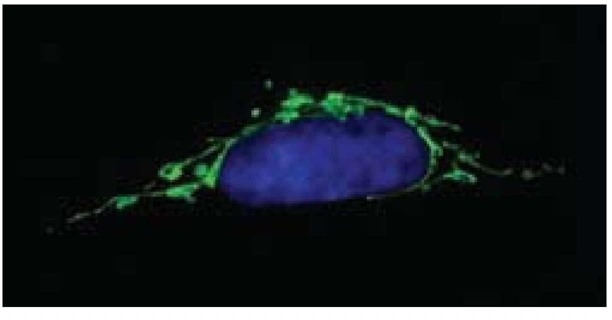
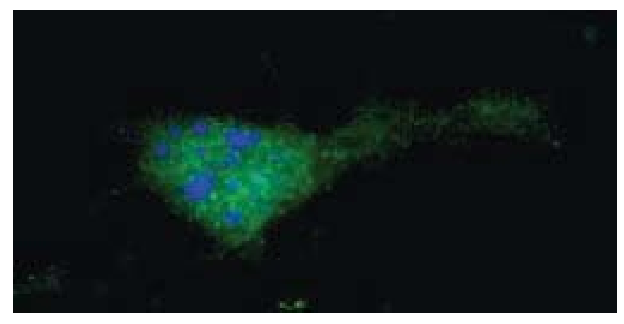


FIGURA 15-36 La vía intrínseca (mediada por mitocondrias) de la apoptosis. Varios tipos de estrés celular hacen que los miembros de la familia de proteínas Bcl-2 que favorecen la apoptosis, como Bax, se inserten en la membrana mitocondrial externa. La inserción de estas proteínas conduce a la liberación de moléculas del citocromo *c* del espacio intermembranoso de las mitocondrias. Se cree que la liberación depende de poros en la membrana mitocondrial que se forman por oligómeros Bax. Una vez en el citosol, las moléculas de citocromo *c* forman un complejo con múltiples subunidades con una proteína citosólica llamada Apaf-1 y moléculas de procaspasa 9. Al parecer, las moléculas de procaspasa 9 alcanzan su actividad proteolítica completa como resultado del cambio de la conformación inducido por su relación con Apaf-1. Las moléculas de caspasa 9 dividen y activan a las caspasas ejecutoras, las cuales realizan la reacción de apoptosis.



(a)



(b)

FIGURA 15-37 Liberación del citocromo *c* y fragmentación nuclear durante la apoptosis. Micrografías con fluorescencia de células de mamífero cultivadas antes (*a*) y después (*b*) del tratamiento con inhibidor de cinasa de proteína citotóxico que activa la vía intrínseca de la apoptosis. En la célula no tratada, el citocromo *c* (verde) se halla en la red mitocondrial y el núcleo permanece intacto (azul). Una vez que se inicia la apoptosis, se libera el citocromo *c* de la mitocondria y se encuentra en toda la célula, mientras que el núcleo se rompe en varios fragmentos. (CORTESÍA DE S. E. WILEY, USCD/WALTHER CANCER INSTITUTE.)

después de que el ion se libera del ER. Casi todas las moléculas del citocromo *c* presentes en todas las mitocondrias de la célula pueden liberarse de una célula apoptósica en un periodo de tan sólo cinco minutos. Se cree que las proteínas antiapoptósicas, como Bcl-2, inhiben de manera directa o indirecta la liberación de citocromo *c* y otras proteínas mitocondriales proapoptósicas que provocan la muerte celular.

La liberación de proteínas mitocondriales proapoptósicas puede ser un fenómeno crucial que destine a la célula a la apoptosis. Una vez en el citosol, el citocromo *c* forma parte de un complejo multiproteico llamado *apoptosoma*, que también incluye varias moléculas de procaspasa 9. Se piensa que las moléculas de procaspasa 9 se activan con la simple unión del complejo multiproteico y no requieren división proteolítica (fig. 15-36). Al igual que la caspasa 8, que se activa por la vía mediada por el receptor descrito antes, la caspasa 9 es una caspasa iniciadora que activa las caspasas ejecutoras corriente abajo, lo cual causa la apoptosis.[3] Al final, las vías externa (mediada por receptor) e interna (mediada por mitocondrias) convergen mediante la activación de las mismas caspasas ejecutoras, que dividen los mismos blancos celulares.

[1] También se han descrito otras vías intrínsecas independientes de Apaf-1 y la caspasa 9 y tal vez también independientes del citocromo *c*.

Es posible preguntarse por qué el citocromo *c*, un componente de la cadena de transporte de electrones, y la mitocondria, un organelo que funciona como planta energética de la célula, participan en el inicio de la apoptosis. Por ahora no hay una respuesta obvia a esta pregunta. El papel clave de las mitocondrias en la apoptosis suscita aún más perplejidad cuando se considera que estos organelos evolucionaron a partir de simbiontes internos procariotas y que los procariotas no sufren apoptosis.

Cuando las células ejecutan el programa de apoptosis, pierden el contacto con sus vecinas y empiezan a encogerse. Al final, la célula se desintegra en un cuerpo apoptósico condensado y rodeado por membrana. Este programa apoptósico completo puede ejecutarse en menos de una hora. Los cuerpos apoptósicos se reconocen por la presencia de fosfatidilserina en su superficie. La fosfatidilserina es un fosfolípido que sólo suele encontrarse en la hoja interna de la membrana plasmática. Durante la apoptosis, una "revoltasa" de fosfolípidos mueve a las moléculas de fosfatidilserina a la hoja externa de la membrana plasmática, donde los macrófagos especializados la reconocen como una señal de fagocitar. Por lo tanto, la muerte celular por apoptosis ocurre sin verter el contenido celular al ambiente extracelular (fig. 15-38). Esto es importante porque la liberación de detritos celulares causaría inflamación, la cual puede provocar daño hístico de consideración.

Tal y como existen señales que destinan la célula a la autodestrucción, también hay señales opuestas que mantienen la supervivencia celular. De hecho, la interacción del TNF con un receptor para TNF transmite a menudo dos señales distintas y contrarias hacia el interior celular: una estimula la apoptosis, la otra promueve la supervivencia celular. Como resultado, la mayoría de las células que tienen receptores para TNF no sufre apoptosis cuando se tratan con TNF. Esto fue un hallazgo decepcionante porque al principio se pensó que el TNF podía usarse como agente para destruir células tumorales. La supervivencia celular casi siempre está mediada por la activación de un factor de transcripción clave llamado NF-κB, que media la expresión de genes que codifican las proteínas para la supervivencia celular. Parecería que el destino de una célula (ya sea la supervivencia o la muerte), depende del equilibrio entre las señales que fomentan y las que impiden la apoptosis.

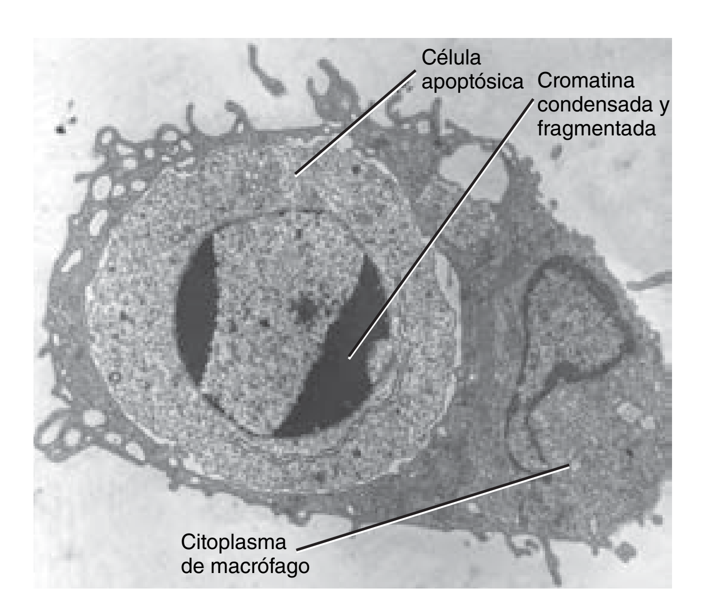


FIGURA 15-38 La eliminación de las células apoptósicas se lleva a cabo por fagocitosis. Esta micrografía electrónica muestra el "cadáver" de una célula apoptósica dentro del citoplasma de un fagocito. Nótese la naturaleza compacta de la célula englobada y el estado denso de su cromatina. (Reimpresa con autorización de Peter M. Henson, Donna L. Bratton y Valerie A. Fadok, Curr Biol 11:R796, 2001.)

REVISIÓN ?

1. ¿Cuáles son algunas de las funciones de la apoptosis en la biología de los vertebrados? Describa los pasos que ocurren entre: a) el momento en que la molécula de TNF se une con su receptor y la muerte final de la célula y b) entre el momento en que el miembro proapoptósico Bcl-2 se une con la membrana mitocondrial externa y la muerte de la célula.
2. ¿Cuál es la función de la formación de complejos que contienen caspasa en el proceso de la apoptosis?

SINOPSIS

La señalización celular es un fenómeno en el que se releva la información a través de la membrana plasmática hacia el interior celular y muchas veces al núcleo celular. Las más de las veces la señalización celular incluye el reconocimiento del estímulo en la superficie externa de la membrana plasmática, la transferencia de la señal por la membrana plasmática y la transmisión de la señal al interior celular, lo que inicia una respuesta. Las reacciones pueden incluir un cambio en la expresión génica, una alteración de la actividad de las enzimas metabólicas, una reconfiguración del citoesqueleto, un cambio de la permeabilidad iónica, la activación de la síntesis de DNA o la muerte de la célula. Este proceso se conoce a menudo como transducción de señal. Dentro de la célula, la información pasa por las vías de señalización, que muchas veces incluye cinasa de proteína y proteinfosfatasas que activan o inhiben sus sustratos mediante cambios en la conformación. Otro rasgo prominente de las vías de señalización es la participación de proteínas de unión con GTP que sirven como interruptores que encienden o apagan la vía (pág. 616).

Muchos estímulos extracelulares (primeros mensajeros) inician respuestas mediante la interacción con un receptor unido con proteína G (GPCR) en la superficie externa de la célula y el estímulo de la liberación de un segundo mensajero dentro de la célula. Muchas moléculas mensajeras extracelulares actúan mediante la unión con receptores que son proteínas integrales de la membrana con siete hélices alfa que cruzan la membrana (GPCR). La señal se transmite del receptor al efector mediante una proteína G heterotrimérica. Estas proteínas se conocen como heterotriméricas porque tienen tres subunidades (alfa, beta y gamma) y como proteínas G porque se unen con nucleótidos de guanina, ya sea GDP o GTP. Cada proteína G puede hallarse en dos estados: un estado activo con un GTP unido o un estado

inactivo con un GDP unido. Se han identificado cientos de receptores unidos con proteínas G diferentes que responden a gran variedad de estímulos. Todos estos receptores actúan mediante un mecanismo similar. La unión del ligando con su receptor específico causa un cambio en la conformación del receptor que aumenta su afinidad por la proteína G. Como resultado, el receptor unido con ligando se une con la proteína G, lo cual hace que la proteína G libere su GDP unido y se una con un nuevo GTP, lo que lleva a la proteína G a su estado activo. El intercambio de nucleótidos de guanina cambia la conformación de la subunidad G_α, lo cual induce la disociación de las otras dos subunidades, que se mantienen juntas como un complejo $G_{\beta\gamma}$. Cada subunidad G_α disociada con su GTP unido puede activar moléculas efectoras específicas, como la adenililciclasa. La subunidad G_α disociada también es una GTPasa y, con la ayuda de una proteína accesoria, hidroliza el GTP unido para formar GDP unido, el cual bloquea la capacidad de la subunidad para activar a más moléculas efectoras. A continuación, el complejo G_α-GDP se relaciona de nueva cuenta con las subunidades $G_{\beta\gamma}$ para reformar el complejo trimérico y devolver el sistema a su estado de reposo. Cada una de las tres subunidades que conforman una proteína G heterotrimérica puede existir en distintas isoformas. Las diversas combinaciones de subunidades específicas componen proteínas G que tienen diferentes propiedades en sus interacciones, con los receptores y los efectores (pág. 620).

La fosfolipasa C es otro efector importante en la superficie interna de la membrana plasmática que pueden activarla las proteínas G heterotriméricas. La PI-fosfolipasa C separa al 4,5-difosfato de fosfatidilinositol (PIP_2) en dos segundos mensajeros diferentes, 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) y 1,2-diacilglicerol (DAG). El DAG permanece en la membrana plasmática, donde activa a la enzima cinasa de proteína C, la cual fosforila los residuos de serina y treonina en varias proteínas blanco. La activación constitutiva de la cinasa de proteína C causa la pérdida del control de crecimiento. El IP_3 es una pequeña molécula hidrosoluble que puede difundirse al citoplasma, donde se une con receptores para IP_3 localizados en la superficie del retículo endoplásmico liso. Los receptores para IP_3 son canales iónicos tetraméricos para calcio; la unión de IP_3 hace que se abran los canales iónicos y el Ca^{2+} se difunda al citosol (pág. 627).

Una vía de señalización, que comienza con un GPCR activado, controla la utilización de glucosa. La degradación de glucógeno en glucosa la estimulan las hormonas adrenalina y glucagon, que actúan como primeros mensajeros mediante la unión con sus receptores respectivos en la superficie externa de las células blanco. La unión de las hormonas activa un efector en la superficie interna de la membrana, la adenililciclasa, lo que conduce a la producción del segundo mensajero AMP cíclico (cAMP) capaz de difundirse. El cAMP genera su respuesta mediante una cascada de reacciones en la que una serie de enzimas se modifican de manera covalente. Las moléculas del AMP cíclico se unen con las subunidades reguladoras de una cinasa de proteína dependiente de cAMP llamada PKA, la cual fosforila a la fosforilcinasa y la sintetasa del glucógeno, lo que da lugar a la activación de la primera enzima y la inhibición de la segunda. Las moléculas de fosforilcinasa activada que agregan fosfatos a la fosforilasa de glucógeno, lo que activa a esta última enzima y conduce a la degradación de glucógeno en 1-fosfato de glucosa, que se convierte en glucosa. Como resultado de esta cascada de reacciones, el mensaje original, que llegó a la superficie celular con la unión de una hormona, se amplifica en gran medida y el tiempo de respuesta disminuye de forma notoria. Las cascadas de reacción de este tipo también suministran varios sitios de regulación. La adición de grupos fosfato por acción de las cinasas se revierte por las fosfatasas que retiran los fosfatos. El AMP cíclico se produce en muchas células distintas como reacción a una gran variedad de primeros mensajeros. El curso de sucesos que ocurre en la célula blanco depende de las proteínas específicas fosforiladas por la cinasa dependiente de AMP cíclico (pág. 629).

Muchos estímulos extracelulares inician una respuesta celular mediante la unión con el dominio extracelular de una proteintirosincinasa receptora (RTK), que activa el dominio de tirosincinasa localizado en la superficie interna de la membrana plasmática. Las RTK regulan diversas funciones, como el crecimiento y proliferación celulares, el curso de la diferenciación celular, la captación de partículas ajenas y la supervivencia celular. Los ligandos estimulantes del crecimiento mejor estudiados, como PDGF, EGF y FGF, activan una vía de señalización llamada cascada de cinasa de MAP que incluye una pequeña proteína monomérica de unión con GTP denominada Ras. Al igual que otras proteínas G, la Ras fluctúa entre una forma inactiva unida con GDP y una forma activa unida con GTP. En su forma activa, estimula a los efectores que se encuentran corriente abajo en la vía de señalización. Como otras proteínas G, la Ras tiene actividad de GTPasa (estimulada por una GAP) que hidroliza el GTP unido para formar GDP unido, con lo que se apaga a sí misma. Cuando un ligando se une con la RTK, la transautofosforilación del dominio citoplásmico del receptor conduce al reclutamiento de Sos, un activador de Ras, a la superficie interna de la membrana. Sos cataliza el intercambio de GDP por GTP, lo que activa a la Ras. La proteína Ras activada tiene una mayor afinidad por otra proteína llamada Raf, que sufre la atracción de la membrana plasmática, donde se convierte en una cinasa de proteína activa que inicia una cadena ordenada de reacciones de fosforilación mostradas en la figura 15-20. Los últimos blancos de la cascada de la cinasa de MAP son factores de transcripción que estimulan la expresión de los genes cuyos productos tienen un papel clave en la activación del ciclo celular, lo que inicia la síntesis de DNA y la división celular. La cascada de cinasa de MAP se encuentra en todos los eucariotas, desde las levaduras hasta los mamíferos, aunque durante la evolución se adaptó para inducir respuestas diferentes en los diversos tipos de células (pág. 634).

La insulina media muchas de sus acciones en las células blanco mediante la interacción con el receptor para insulina, que es una RTK. La cinasa activada agrega grupos fosfato a los residuos de tirosina localizados en el receptor y las proteínas de acoplamiento relacionadas con el receptor llamadas IRS. Los residuos fosforilados de tirosina de una IRS sirven como sitios de acoplamiento para las proteínas que tienen dominios SH2, las cuales se activan con la unión con IRS. Varias vías de señalización separadas pueden activarse como resultado de distintas proteínas de señalización que se unen con una IRS fosforilada. Una vía puede estimular la síntesis de DNA y la división celular, otra puede estimular el movimiento de los transportadores de glucosa a la membrana celular y otras más pueden activar los factores de transcripción que inician la expresión de un conjunto de genes específicos de insulina (pág. 641).

La rápida elevación del Ca^{2+} citosólico, inducida por la abertura de los canales iónicos en las membranas citoplásmicas o la membrana plasmática, inicia una gran variedad de reacciones celulares. La concentración normal de iones Ca^{2+} en el citosol se mantiene en cerca de 10^{-7} M por la acción de bombas de calcio situadas en la membrana plasmática y la membrana del retículo endoplásmico liso. Muchos estímulos diferentes (desde un espermatozoide hasta un impulso nervioso que llega a una célula muscular), propician un aumento súbito de la concentración citosólica de calcio, la cual puede seguir a la abertura de los canales del Ca^{2+} en la membrana plasmática, receptores de IP_3 o receptores de rianodina, que son un tipo diferente de canal del calcio ubicado en la membrana del retículo endoplásmico liso. Según sea el tipo de célula, los canales de rianodina pueden abrirse por un potencial de acción que llega a la célula o por la entrada de una pequeña cantidad de calcio por la membrana plasmática. Entre las respuestas del aumento de la concentración citosólica de calcio, algunas son la activación o inhibición de varias enzimas y sistemas de transporte, fusión de membrana o alteraciones de las funciones contráctiles o del citoesqueleto. El calcio no actúa sobre estos diversos blancos en su estado iónico libre, sino que se une con un pequeño grupo de proteínas para unión

con calcio, que a su vez inducen la respuesta. La más difundida de estas proteínas es la calmodulina, que contiene cuatro sitios para unión con calcio. El ion calcio también es un mensajero intracelular importante en las células vegetales, donde media las respuestas a diversos estímulos, incluidos cambios de la luz, presión, gravedad y la concentración de hormonas vegetales como el ácido abscísico (pág. 645).

Las diferentes vías de señalización se interconectan con frecuencia. Como resultado, las señales de diversos ligandos no relacionados pueden converger para activar a un efector común, como Ras; las señales del mismo ligando pueden divergir para activar varios efectores diferentes y las señales pueden pasar en uno y otro sentidos entre distintas vías (comunicación cruzada) (pág. 649).

El óxido nítrico actúa como mensajero intercelular que se difunde en forma directa por la membrana plasmática de la célula blanco. Entre las actividades que estimula el NO está la relajación de las células de músculo liso que recubren los vasos sanguíneos. El NO se produce por acción de la enzima sintetasa del óxido nítrico, que emplea arginina como sustrato. A menudo el NO funciona mediante la activación de la guanililciclasa para producir el segundo mensajero cGMP (pág. 652).

Las vías de señalización pueden conducir a la apoptosis, la muerte celular programada. Los ejemplos de apoptosis incluyen la muerte del exceso de células nerviosas, la muerte de linfocitos T que reaccionan con los propios tejidos del cuerpo y la muerte de las células cancerosas potenciales. La muerte por apoptosis se caracteriza por la compactación general de la célula y su núcleo, con disección ordenada de la cromatina por efecto de endonucleasas especiales. La apoptosis está mediada por enzimas proteolíticas llamadas caspasas que activan o desactivan sustratos proteicos clave mediante la eliminación de una parte de su cadena polipeptídica. Se han identificado dos vías distintas de apoptosis, una iniciada por estímulos extracelulares que actúan mediante receptores de muerte, como TNFR1, y la otra desencadenada por estrés celular interno que actúa a través de la liberación de citocromo *c* del espacio intermembranoso de la mitocondria y la activación de miembros proapoptósicos de la familia de la proteína Bcl-2 (pág. 653).

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. El tema de la señalización celular se incluyó cerca del final del libro porque reúne muchos temas distintos de la biología celular. Tras leer el capítulo por completo, ¿está de acuerdo o no con esta declaración? Sustente sus conclusiones con un ejemplo.
2. Suponga que la vía de señalización de la figura 15-3 condujera a la activación de un gen que inhibe una cinasa dependiente de ciclina encargada de impulsar a la célula a la fase S del ciclo celular. ¿De qué manera una mutación debilitante en la cinasa de proteína 3 afectaría el crecimiento celular?
3. ¿Cuál podría ser el efecto sobre la función hepática de una mutación en un gen que codifica una fosfodiesterasa de cAMP, una mutación en un gen que codifique un receptor para glucagon, una mutación en un gen que codificara la fosforilcinasa y una mutación que alterara el sitio activo de la GTPasa de una subunidad G_α? (Asuma que en todos los casos la mutación causa una pérdida de función del producto génico.)
4. Ca^{2+}, IP_3 y cAMP se describieron como segundos mensajeros. ¿En qué forma son similares y distintos sus mecanismos de acción?
5. En la cascada de reacciones ilustrada en la figura 15-20, ¿qué pasos conducen a la amplificación y cuáles no?
6. Suponga que la adrenalina y la noradrenalina pudieran iniciar una respuesta similar en una célula blanco particular. ¿Cómo determinaría si los dos compuestos actúan mediante la unión con el mismo receptor en la superficie celular o no?
7. Uno de los experimentos clave para mostrar que las uniones comunicantes (pág. 266) permiten el paso de pequeñas moléculas se realizó al permitir que las células del músculo cardiaco (que se contraen como respuesta a la adrenalina) formaran uniones comunicantes con células de la granulosa ovárica (que responden a la FSH con varios cambios metabólicos). Luego, los investigadores agregaron FSH al cultivo celular mixto y observaron la contracción de las células musculares. ¿De qué manera las células musculares reaccionan a la FSH y qué supone esto acerca de la estructura y función de las uniones comunicantes?
8. ¿Cómo esperaría que un análogo de GTP que la célula no pudo hidrolizar (un análogo no hidrolizable) afectara los fenómenos de señalización que ocurren durante la estimulación de una célula hepática por el glucagon?, ¿cuál sería el efecto del mismo análogo en la transducción de la señal de una célula epitelial después de la exposición al factor de crecimiento epidérmico (EGF)?, ¿cómo se compararía esto con los efectos de la toxina del cólera (pág. 624) en estas mismas células?
9. Usted sospecha que la fosfatidilcolina podría servir como precursora de un segundo mensajero que inicia la secreción de una hormona en un tipo de célula endocrina cultivada que está bajo estudio. Además, sospecha que el segundo mensajero liberado por la membrana plasmática como reacción a un estímulo es el fosfato de colina. ¿Qué tipo de experimento podría llevar a cabo para comprobar su hipótesis?
10. La figura 15-25 muestra los cambios localizados en $[Ca^{2+}]$ dentro del árbol dendrítico de una célula de Purkinje. Los iones de calcio son agentes pequeños que se difunden con rapidez. ¿Cómo es posible que una célula mantenga diferentes concentraciones de este ion libre en distintas regiones del citosol?, ¿qué sospecha que sucedería si inyectara un volumen pequeño de una solución de cloruro de calcio en una región de una célula inyectada ya antes con una sonda de calcio fluorescente?
11. Formule una hipótesis que explique cómo el contacto de la superficie externa de un huevo con un espermatozoide produce una oleada de liberación de Ca^{2+} que se extiende a todo el huevo, como se muestra en la figura 15-27.
12. Como la calmodulina activa muchos efectores diferentes (p. ej., cinasas de proteína, fosfodiesterasas, proteínas transportadoras de calcio), una molécula de calmodulina debe tener muchos sitios diferentes en su superficie. ¿Está de acuerdo con esta declaración?, ¿por qué sí o por qué no?
13. La diabetes es una enfermedad que puede aparecer por varios defectos distintos de la función de la insulina. Describa tres anormalidades moleculares diferentes en una célula hepática que pueden hacer que distintos pacientes muestren un cuadro clínico similar que incluya, por ejemplo, altas concentraciones de glucosa en sangre y orina.
14. ¿Esperaría que una respuesta celular al EGF fuera más sensible a la fluidez de la membrana plasmática que su respuesta a la insulina?, ¿por qué sí o por qué no?

15. ¿Esperaría que una mutación en Ras fuera una causa dominante o recesiva en el origen del cáncer?, ¿por qué? (Una mutación dominante produce su efecto cuando sólo muta uno de los alelos homólogos, mientras que una mutación recesiva requiere que ambos alelos del gen estén afectados.)
16. Conjeture acerca del mecanismo por el cual la apoptosis podría tener un papel crucial para combatir el desarrollo del cáncer, un tema que se trata en el capítulo siguiente.
17. Usted trabaja con un tipo de fibroblasto que en condiciones normales responde al factor de crecimiento epidérmico, con un aumento de su ritmo de crecimiento y división, y a la adrenalina, con un descenso de la velocidad de crecimiento y división. Ya comprobó que ambas reacciones requieren la vía de la cinasa de MAP y que el EGF actúa mediante una RTK y la adrenalina a través de un receptor unido a proteína G. Suponga que identifica una cepa mutante de estas células que aún puede responder al EGF, pero ya no se inhibe con la adrenalina. Sospecha que la mutación afecta la comunicación cruzada entre dos vías (mostradas en la figura 15-32). ¿Qué componente de esta figura podría afectarse por tal mutación?
18. ¿Qué similitud tiene la oleada de calcio que ocurre después de la fecundación con un impulso nervioso que viaja por una neurona?
19. Ahora que leyó la sección sobre la percepción del gusto, ¿por qué supone que resultara difícil encontrar venenos efectivos para ratas?
20. Uno de los genes del virus de la vacuna codifica una proteína llamada CrmA que es un inhibidor potente de las caspasas. ¿Qué efecto esperaría que tuviera este inhibidor en una célula infectada?, ¿por qué resulta esto ventajoso para el virus infectante?
21. La mayoría de las RTK actúa en forma directa sobre los efectores corriente abajo, mientras que la RTK de la insulina actúa mediante una proteína de acoplamiento intermediaria, un sustrato receptor de insulina (IRS). ¿Existe alguna ventaja en la señalización que pudiera derivar del uso de estos IRS intermediarios?
22. Los investigadores han informado que: a) la mayoría de los efectos fisiológicos de la insulina sobre las células blanco pueden bloquearse mediante la incubación de células con wortmanina, un compuesto que inhibe en forma específica la enzima PI3K, y b) que el impulso para que las células expresen de modo exagerado una forma con actividad constitutiva de PKB (una forma de la enzima que siempre está activa sin importar las circunstancias) induce una reacción en las células idéntica a la que suscita la adición de insulina a estas células. Al observar la figura 15-23, ¿puede decirse que esto era lo previsto?, ¿por qué sí o por qué no?
23. Los ratones manipulados de forma genética incapaces de producir caspasa 9 mueren como resultado de varios defectos, en particular un cerebro muy grande. ¿Por qué estos ratones tienen tal fenotipo?, ¿en qué esperaría que el fenotipo de un ratón con eliminación genética del citocromo *c* fuera comparable al ratón en el cual se suprimió la caspasa 9?
24. ¿Por qué supone que algunas personas consideran que un compuesto llamado PROP tiene un sabor amargo, mientras que otras no lo perciben?

SITIO EN INTERNET www.wiley.com/college/karp

Las animaciones y los videos indicados en este capítulo pueden visitarse en el sitio de Cell and Molecular Biology de Karp en Internet. También hallará todas las respuestas a las preguntas analíticas recién planteadas, autoexámenes que le ayudarán a prepararse para los exámenes, y vínculos con fascinantes recursos. La sección lecturas adicionales que sigue se amplía en el sitio en Internet.

LECTURAS ADICIONALES

Aggarwal, B. B. 2003. Signaling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Revs. Immunol.* 3:745–756.
Alonso, J. M. & Stepanova, A. N. 2004. The ethylene signaling pathway. *Science* 306:1513–1515.
Assmann, S. M. 2005. G proteins so green: a plant G protein signaling FAQ sheet. *Science* 310:71–73.
Baillie, G. S. & Houslay, M. D. 2005. Arrestin times for compartmentalised cAMP signalling and phosphodiesterase-4 enzymes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:129–134.
Carafoli, E. 2004. Calcium-mediated cellular signals: a story of failures. *Trends Biochem. Sci.* 29:371–379.
Carey, S. P. L., et al. 2006. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. *Trends Biochem. Sci.* 31:231–239.
Chandrashekar, J., et al. 2006. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444:288–294.
Danial, N. N. & Korsmeyer, S. J. 2004. Cell death: critical control points. *Cell* 116:205–219.
Dennis, C. 2004. The sweet smell of success. *Nature* 428:362–364.
Edinger, A. L. & Thompson, C. B. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16:663–669.
Edmunds, J. W. & Mahadevan, L. C. 2004. MAP kinases as structural adaptors and enzymatic activators in transcriptional complexes. *J. Cell Sci.* 117:3715–3723.
Halstead, J. R., et al. 2005. An emerging role for PtdIns (4,5)P_2-mediated signalling in human disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 26:654–660.
Inoki, K. & Guan, K.-L. 2006. Complexity of the TOR signaling network. *Trends Cell Biol.* 16:206–212.
Johnson, T. O., et al. 2002. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes. *Nature Revs. Drug Disc.* 1: 696–709.
Kiberstis, P.A., et al. 2005. Articles on insulin and type 2 diabetes. *Science* 307:369–387.
Kolch, W. 2005. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 6:827–837.

Langeberg, L. K. & Scott, J. D. 2005. A-kinase anchoring proteins. *J. Cell Sci.* 118:3217–3220.

Li, P., et al. 2004. Mitochondrial activation of apoptosis. *Cell* S116: S57–S59. [perspectiva histórica.]

Malbon, C. C. 2005. G proteins in development. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 6:689–701.

Mitin, N., et al. 2005. Sgnaling interplay in Ras superfamily function. *Curr. Biol.* 15:R563–R574.

Moller, D. E. & Kaufman, K. D. 2005. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu. Rev.Med.* 56:45–62.

Murphy, L. O. & Blenis, J. 2006. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem. Sci.* 31:268–275.

Niggli, V. 2005. Regulation of protein activities by phosphoinositide phosphates. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:57–79.

Pawson, T. 2004. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* 116:191–203.

Pawson, T. & Scott, J. D. 2005. Protein phosphorylation in signaling—50 years and counting. *Trends Biochem. Sci.* 30:286–290.

Pierce, K. L., et al. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 3:639–650.

Riedl, S. J. & Shi, Y. 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 5:897–907.

Scott, K. 2005. Taste recognition: food for thought. *Neuron* 48:455–464.

Shi, Y. 2004. Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* 117:855–858.

Spierings, D., et al. 2005. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science* 310:66–67.

Tonks, N. K., 2006. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature Revs. Mol. Cell Biol.* 7:833–846.

Weinstein, L. S., et al. 2006. Genetic diseases associated with heterotrimeric G proteins. *Trends Pharmacol. Sci.* 27:260–266.

Wymann, M. P. & Marone, R. 2005. Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:141–149.

Watson, R. T. & Pessin, J. E. 2006. Bridging the GAP between insulin signaling and GLUT4 translocation. *Trends Biochem. Sci.* 31:215–222.

Wettschureck, N. & Offermanns, S. 2005. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol. Revs.* 85:1159–1204.

Willis, S. N. & Adams, J. M. 2005. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:617–625.

Wullschleger, S., et al. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124:471–484.

CAPÍTULO 16

Cáncer

El cáncer es una enfermedad genética porque puede rastrearse hasta alteraciones dentro de genes específicos, pero en la mayoría de los casos no es una enfermedad hereditaria. En una anormalidad hereditaria, el defecto genético se halla en los cromosomas de uno de los padres y se transmite al cigoto. En cambio, las alteraciones genéticas que conducen a la mayoría de los cánceres surgen en el DNA de una célula somática durante la vida del individuo afectado. A causa de estos cambios genéticos, las células cancerosas proliferan de manera incontrolable y producen tumores malignos que invaden el tejido sano circundante (fig. 16-1). Mientras el crecimiento del tumor permanezca localizado, la enfermedad casi siempre puede tratarse y curarse mediante la extirpación quirúrgica de la neoplasia. Sin embargo, los tumores malignos son propensos a la *metástasis*, es decir, a diseminar células que se separan de la masa original, ingresan a la circulación linfática o sanguínea y se extienden a sitios distantes del cuerpo, donde establecen tumores secundarios fatales (*metástasis*) que ya no son susceptibles de extirpación quirúrgica.

Por su efecto en la salud humana y por la esperanza de desarrollar una curación, el cáncer ha sido el centro de un enorme esfuerzo de investigación durante decenios. Aunque estos estudios han conducido a un avance notable en la comprensión de las bases celulares y moleculares del cáncer, han tenido poca repercusión en la prevención de la aparición tumoral o el aumento en la probabilidad de sobrevivir a la mayoría de los tumores cancerosos. La figura 16-2 muestra la incidencia de los diversos tipos de cáncer en Estados Unidos y los índices de mortalidad correspondientes. Los tratamientos actuales, como la quimioterapia y la radiación, carecen de la especificidad necesaria para destruir a las células cancerosas sin ocasionar graves efectos colaterales que acompañan

Cráneo con cigarrillo. (Vincent van Gogh, 1885, Museo van Gogh, Amsterdam/© Art Resource, NY.)

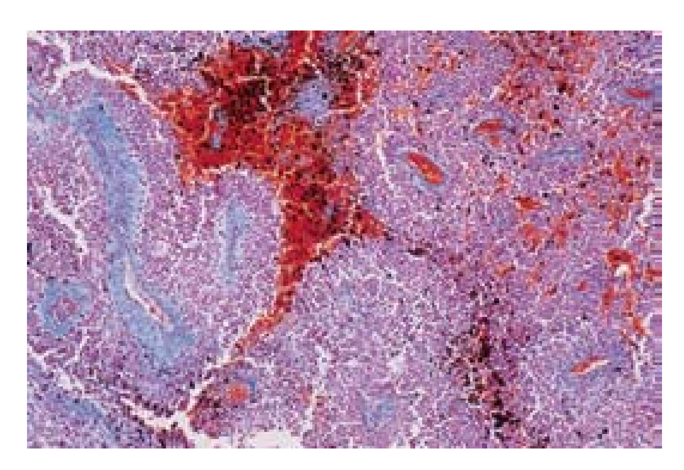


FIGURA 16-1 Invasión de tejido normal por un tumor en crecimiento. Esta micrografía óptica de un corte de hígado humano muestra un melanosarcoma metastásico (en rojo) que invade el tejido hepático normal. (MICROGRAFÍA DE ASTRID Y HANNS-FRIEDER MICHLER/SCIENCE PHOTO LIBRARY/PHOTO RESEARCHERS, INC.)

a estos tratamientos. Como resultado, los pacientes casi nunca pueden someterse a las dosis lo bastante elevadas de fármacos o radiación para destruir todas las células tumorales que hay en su cuerpo. Los investigadores en cáncer han trabajado durante muchos años para desarrollar tratamientos más efectivos y menos debilitantes. Al final de este capítulo se describen algunas de estas nuevas formas terapéuticas del cáncer.

16.1 PROPIEDADES BÁSICAS DE UNA CÉLULA CANCEROSA

El comportamiento de las células cancerosas es más fácil de estudiar cuando las células crecen en cultivos. Las células cancerosas pueden obtenerse si se extirpa un tumor maligno, se separa el tejido en sus células componentes y se cultivan las células in vitro. Con el paso de los años, se han recolectado muchas líneas celulares diferentes de células cultivadas obtenidas de tumores humanos en bancos celulares y están disponibles para estudio. Una alternativa consiste en convertir las células normales en células cancerosas mediante sustancias carcinógenas, radiación o virus tumorales. Las células que se transformaron in vitro con sustancias o virus casi siempre producen tumores cuando se introducen en un animal hospedador. Hay muchas diferencias entre las propiedades de un tipo de célula cancerosa y otro, pero al mismo tiempo existen varias propiedades básicas que comparten todas las células cancerosas, sin importar cuál sea el tejido de origen.

A nivel celular, la característica más importante de una célula cancerosa, sea que se encuentre en el cuerpo o en una caja de cultivo, es la pérdida de control del crecimiento. La *capacidad* para crecer y dividirse no es muy distinta a la de las células normales. Cuando las células normales crecen en un cultivo en condiciones que promueven la proliferación celular, crecen y se dividen a un ritmo similar al de sus contrapartes malignas. Sin embargo, cuando las células normales proliferan hasta el punto en que cubren el fondo del platillo de cultivo, su ritmo de crecimiento disminuye en grado notable y tienden a mantener una sola capa (*monocapa*) de células (fig. 16-3*a*, *b*). La velocidad de crecimiento disminuye conforme las células normales responden a las influencias inhibidoras de su ambiente. Las influencias inhibidoras del crecimiento pueden ser resultado del agotamiento de los factores de crecimiento en el medio de cultivo o del contacto con las células circundantes en el platillo. En cambio, cuando las células malignas se cultivan en las mismas condiciones, continúan su crecimiento y se apilan una sobre otra para formar cúmulos (fig. 16-3*c*, *d*). Es evidente que las células malignas no reaccionan a los tipos de señales que cesan el crecimiento y la división de las células normales.

Las células cancerosas no sólo ignoran las señales que inhiben el crecimiento, sino que prosiguen su crecimiento en ausencia de las señales estimulantes del crecimiento que requieren las células normales. El crecimiento celular normal en cultivo depende de factores de crecimiento, como el factor de creci-

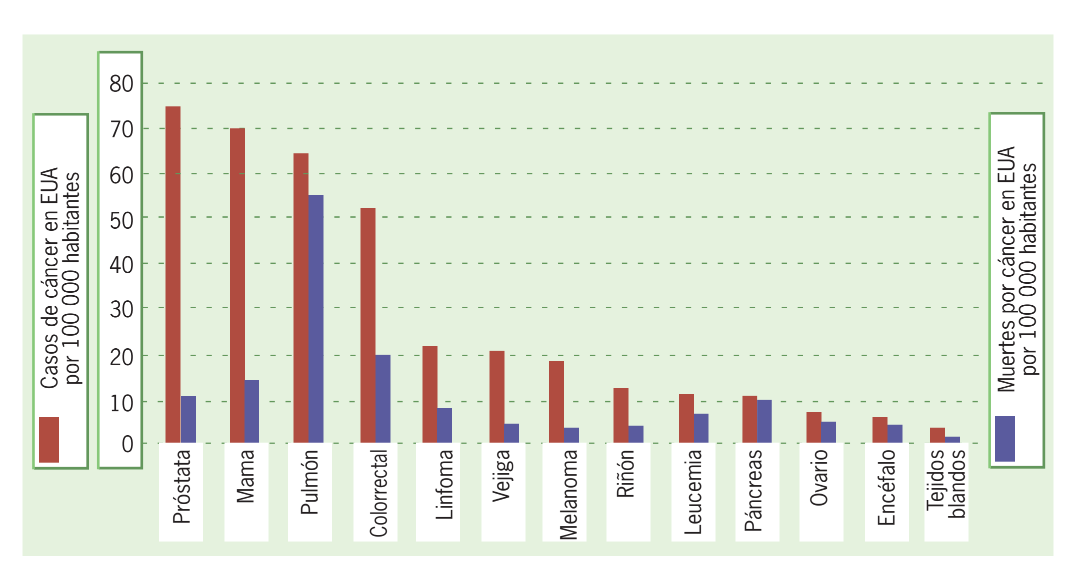


FIGURA 16-2 Incidencia de nuevos casos de cáncer y muertes en Estados Unidos (2000-2003).

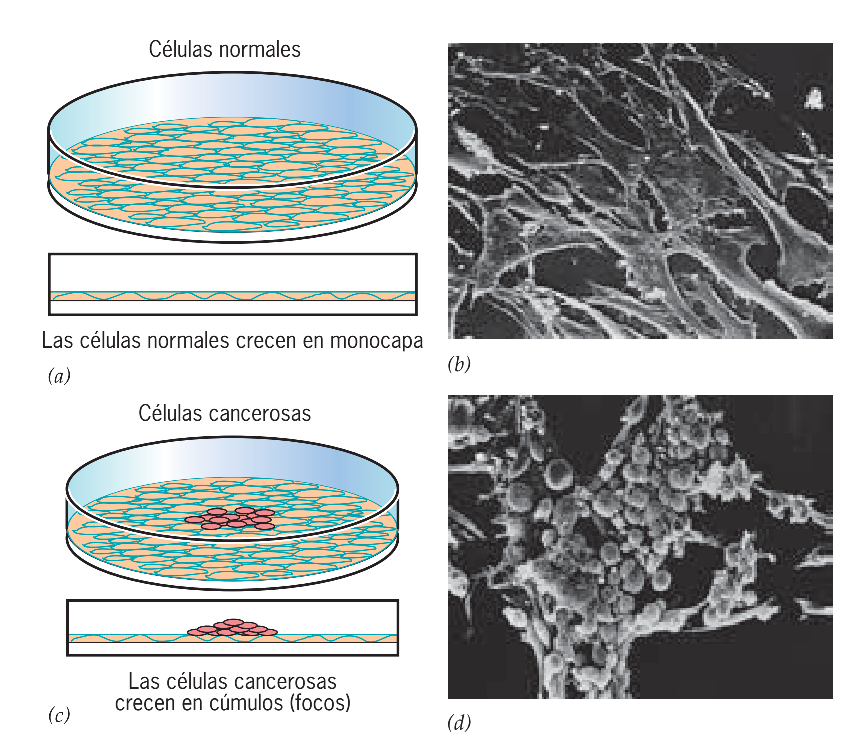


FIGURA 16-3 Propiedades de crecimiento de las células normales y las cancerosas. Las células normales típicas crecen en una caja de cultivo hasta que cubren la superficie con una monocapa (*a*) y (*b*). En cambio, las células que se transformaron por acción de virus o sustancias carcinógenas (o células malignas que se cultivaron a partir de tumores) crecen en cúmulos de muchas capas o focos (*c*) y (*d*). (*B* y *D*, cortesía de G. Steven Martin.)

miento epidérmico y la insulina, presentes en el suero (la fracción líquida de la sangre), que casi siempre se agrega al medio de cultivo (fig. 16-4). Las células cancerosas pueden proliferar en ausencia de suero porque su ciclo celular no depende de las señales transmitidas por los receptores para factores de crecimiento situados en su superficie (pág. 634). Como se verá enseguida, esta transformación es resultado de cambios básicos en las vías intracelulares que rigen la proliferación y la supervivencia celulares.

Las células normales que crecen en cultivo tienen una capacidad limitada para la división celular; después de cierto número de divisiones mitóticas presentan un proceso de envejecimiento que las vuelve inadecuadas para continuar el crecimiento y la división (pág. 505). Por otro lado, las células cancerosas parecen

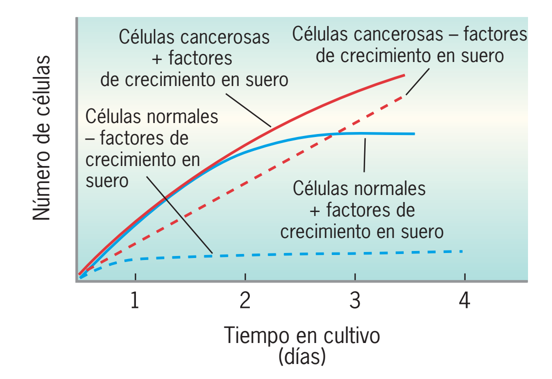


FIGURA 16-4 Efectos de la privación de suero en el crecimiento de las células normales y las transformadas. Mientras que el crecimiento de las células malignas continúa sin importar la presencia o ausencia de factores de crecimiento exógenos, las células normales requieren estas sustancias en el medio para continuar su crecimiento. El crecimiento de las células normales se nivela cuando los factores de crecimiento se agotan.

inmortales porque se dividen en forma indefinida. Esta diferencia en el potencial de crecimiento se atribuye a menudo a la presencia de telomerasa en las células cancerosas, enzima ausente de las células normales. Hay que recordar que en la página 505 se explicó que la telomerasa mantiene los telómeros en los extremos de los cromosomas, lo que permite que las células continúen la división. Se cree que la ausencia de telomerasa en la mayoría de las células normales es una de las principales defensas que protegen al cuerpo contra el crecimiento de tumores.

Las alteraciones más llamativas en el núcleo después de la transformación suceden dentro de los cromosomas. Las células normales mantienen su complemento cromosómico diploide mientras crecen y se dividen, in vivo e in vitro. En cambio, las células malignas tienen muchas veces complementos cromosómicos muy anormales, lo que se conoce como *aneuploidía* (fig. 16-5), que puede ocurrir principalmente como resultado de defectos en el punto de revisión mitótico (pág. 592).[1] Resulta evidente que el crecimiento de las células cancerosas es mucho menos dependiente de un contenido cromosómico diploide estándar que el crecimiento de las células normales. De hecho, cuando el contenido cromosómico de una célula normal se altera, por lo general se activa una vía de señalización que conduce a la autodestrucción (apoptosis) de la célula. En cambio, las células malignas casi nunca inducen la apoptosis, incluso cuando el contenido cromosómico se altere de forma notoria. La protección contra la apoptosis es otra característica importante que distingue a muchas células cancerosas de las normales. Finalmente, puede observarse que en multitud de casos las células cancerosas también dependen de vías metabólicas anaerobias, como glucólisis y fermentación, en mucho mayor grado que sus contra-

[1] Existe controversia acerca de si el desarrollo de la aneuploidía ocurre en una etapa temprana de la formación del tumor y es la causa de la inestabilidad genética que caracteriza a las células cancerosas, o bien si se trata de un fenómeno tardío y una mera consecuencia del crecimiento canceroso anormal.

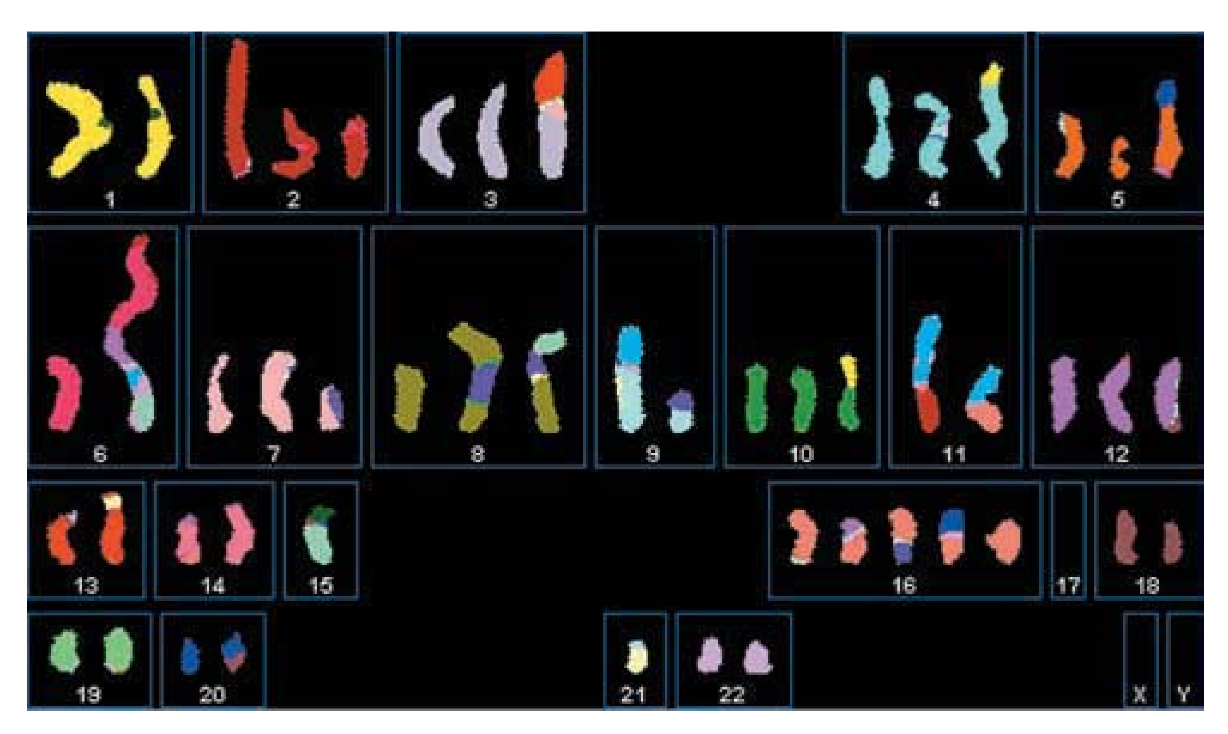


FIGURA 16-5 Cariotipo de una célula de una línea de cáncer mamario que muestra un complemento cromosómico muy anormal. Una célula diploide normal tendría 22 pares de autosomas y dos cromosomas sexuales. Los dos miembros de un par serían idénticos y cada cromosoma tendría un solo color continuo (como en el cariotipo de una célula normal en la figura 12-18*b* que utiliza la misma técnica de visualización espectral.) Los cromosomas de esta célula están muy alterados, como lo demuestra la presencia de cromosomas adicionales y faltantes, así como cromosomas con más de un color. Estos cromosomas multicolores reflejan la gran cantidad de translocaciones que ocurrieron en las generaciones celulares previas. Una célula con puntos de revisión normales en el ciclo celular y vías apoptósicas normales nunca alcanzaría un complemento cromosómico similar al observado aquí. (CORTESÍA DE J. DAVIDSON Y PAUL A. W. EDWARDS.)

partes normales. Esta propiedad puede deberse a sus elevadas necesidades metabólicas y al riego sanguíneo insuficiente.

Son estas propiedades de las células cancerosas (que pueden demostrarse en cultivo), junto con su tendencia a diseminarse a sitios distantes del cuerpo, lo que las convierte en una amenaza tan grande para el bienestar de todo el organismo.

REVISIÓN

1. Describa algunas de las propiedades que distinguen a las células cancerosas de las normales.
2. ¿Cómo se manifiestan las propiedades de las células malignas en cultivo?

16.2 LAS CAUSAS DEL CÁNCER

En 1775, Percivall Pott, un cirujano británico, estableció la primera relación conocida entre un agente ambiental y el desarrollo de cáncer. Pott concluyó que la elevada incidencia de cáncer en la cavidad nasal y la piel del escroto de los limpiadores de chimeneas se debía a su exposición crónica al hollín. En los últimos decenios se aislaron las sustancias carcinógenas del hollín, junto con otros cientos de compuestos con capacidad demostrada para inducir cáncer en animales de laboratorio. Además del conjunto diverso de sustancias, hay varios tipos más de agentes que también son carcinógenos, como la radiación ionizante y diversos virus de DNA y RNA. Todos estos agentes tienen una propiedad común: alteran el genoma. Por lo general, puede demostrarse que las sustancias carcinógenas, como las que se encuentran en el hollín o el humo de los cigarrillos, inducen mutaciones en forma directa o se convierten en compuestos mutágenos por acción de enzimas celulares. De igual forma, la radiación ultravioleta, principal causa de cáncer cutáneo, también es un mutágeno potente.

Varios virus pueden infectar células de mamíferos en cultivos celulares y las transforman en células cancerosas. En términos generales, estos virus se dividen en dos grandes grupos: **virus tumorales de DNA** y **virus tumorales de RNA**, según sea el tipo de ácido nucleico que se encuentre dentro de la partícula viral madura. Entre los virus de DNA capaces de transformar a las células figura el poliomavirus, el virus de los simios 40 (SV40), adenovirus y virus similares al del herpes. Los virus tumorales de RNA, o retrovirus, tienen una estructura semejante a la del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (véase fig. 1-21*b*) y son el tema de la sección Vías experimentales que se encuentra al final del capítulo. Los virus tumorales pueden transformar las células porque portan genes cuyos productos interfieren con las actividades normales que regulan el crecimiento celular. Aunque los virus tumorales tuvieron un valor incalculable para los investigadores en la identificación de muchos genes participantes del origen de las neoplasias, los virus sólo se relacionan con una

pequeña fracción de las variantes del cáncer en humanos. En la mayoría de los casos, estos virus incrementan en gran medida el riesgo de una persona para desarrollar cáncer en vez de ser el único factor causante de la enfermedad. Esta relación entre la infección viral y el cáncer la ilustra el virus del papiloma humano (HPV), que puede transmitirse mediante relaciones sexuales y cuya frecuencia va en aumento en la población. Si bien el virus se encuentra en casi 90% de las pacientes con cáncer del cuello uterino, algo indicativo de su importancia en el desarrollo de la enfermedad, la gran mayoría de las mujeres infectadas con el virus nunca desarrollan este tumor maligno. En la actualidad se dispone de una vacuna contra este virus. Otros virus vinculados con cánceres humanos incluyen el virus de la hepatitis B, que se relaciona con cáncer hepático; el virus de Epstein-Barr, vinculado con el linfoma de Burkitt; y un tipo de virus del herpes (HHV-8) que se relaciona con el sarcoma de Kaposi. La participación del SV40 en el cáncer humano es un tema muy complicado porque el virus fue producto de la contaminación de las primeras vacunas contra la polio que se aplicaron a millones de personas antes de 1963. Ciertos linfomas gástricos se vinculan con la infección crónica por la bacteria residente del estómago *Helicobacter pylori*, que también es la causante de úlceras. Datos recientes sugieren que muchos de estos cánceres vinculados con infecciones en realidad son causados por la inflamación crónica inducida por la presencia del patógeno. La enteropatía inflamatoria (*inflammatory bowel disease*, IBD), que también se caracteriza por inflamación crónica, se ha relacionado con mayor riesgo de cáncer de colon.

La identificación de las causas de los distintos tipos de cáncer es una tarea que corresponde a los *epidemiólogos*, investigadores que estudian los patrones de las enfermedades en las poblaciones. Las causas de ciertos cánceres son evidentes: el tabaquismo provoca cáncer pulmonar, la exposición a la radiación ultravioleta da origen a cáncer cutáneo, y la inhalación de fibras de asbesto ocasiona mesotelioma. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de estudios, aún no se conocen con certeza las causas de la mayoría de los cánceres humanos. Las personas viven en ambientes complejos y se exponen a muchos carcinógenos potenciales con un patrón cambiante a lo largo de decenios. El intento de reconocer las causas del cáncer a partir de una montaña de datos obtenidos de las respuestas a cuestionarios sobre los estilos de vida individuales ha sido muy difícil. La importancia de los factores ambientales (p. ej., la dieta) se advierte con más claridad en los estudios con hijos de parejas que migraron de Asia a Estados Unidos o Europa. Estas personas ya no tienen un alto índice de cáncer gástrico, como se observa en Asia, pero en su lugar padecen un riesgo elevado de cáncer de colon y mama, característico de los países occidentales (fig. 16-6).

Existe un consenso entre los epidemiólogos de que ciertos ingredientes de la dieta, como las grasas animales y el alcohol, incrementan el riesgo de cáncer, mientras que ciertos compuestos de las frutas, verduras y té pueden reducir ese riesgo. Al parecer, varios medicamentos ampliamente prescritos también tienen un efecto preventivo. Ya se demostró que el uso prolongado de los antiinflamatorios no esteroideos, como el ácido acetilsalicílico y la indometacina, reduce en gran proporción el riesgo de cáncer de colon. Se cree que este efecto se obtiene mediante la inhibición de la ciclooxigenasa 2, una enzima que cataliza la síntesis de prostaglandinas similares a hormonas, las cuales promueven el crecimiento de pólipos intestinales.

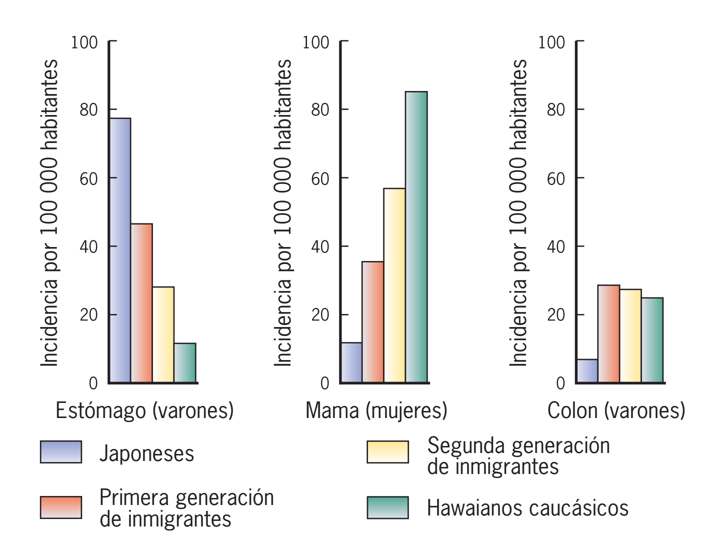


FIGURA 16-6 Incidencia cambiante de cáncer en personas de ascendencia japonesa después de la inmigración a Hawai. La incidencia de cáncer estomacal declina, mientras que la del de mama y colon aumenta. Sin embargo, de los tres tipos de cáncer, sólo el de colon ha alcanzado tasas equivalentes a las de los hawaianos caucásicos en la segunda generación. (Tomada de L. N. Kolonel, et al., reimpresa con autorización de Nature Revs. Cancer 4:3, 2004; © 2004, Macmillan Magazines Ltd.)

16.3 LA GENÉTICA DEL CÁNCER

El cáncer es una de las dos primeras causas de muerte en países occidentales, y afecta a cerca de uno de cada tres individuos. Visto de esta forma, el cáncer es una enfermedad muy frecuente. Sin embargo, a nivel celular, el desarrollo de un tumor canceroso es un fenómeno muy raro. Cuando se realiza un escrutinio genético de las células de un tumor canceroso, siempre se encuentra que éstas surgieron de una sola célula. Por lo tanto, a diferencia de otras afecciones que requieren modificación de una gran cantidad de células, el cáncer se debe a la proliferación descontrolada de una sola célula extraña (se dice que el cáncer es *monoclonal*). Considérese por un momento que el cuerpo humano tiene trillones de células, billones de las cuales se someten a división celular cualquier día determinado. Aunque casi todas estas células en división tienen el potencial de cambiar su composición genética y crecer hasta formar un tumor maligno, esto sólo ocurre en cerca de un tercio de la población humana durante toda su vida.

Una de las principales razones por las que más células no originan tumores cancerosos es que la transformación maligna requiere más que una sola alteración genética. El desarrollo de un tumor maligno (*carcinogenia*) es un proceso con múltiples pasos que se caracteriza por una progresión de alteraciones permanentes en una sola línea de células, lo que puede ocurrir en el transcurso de muchas divisiones celulares sucesivas y requerir de varios años para completarse. Cada cambio genético puede inducir una característica específica del estado maligno, como la protección contra la apoptosis, como se expone en la sección 16-1. Conforme estos cambios genéticos ocurren gradualmente, las células de la línea se hacen cada vez menos reactivas a la maquinaria reguladora normal del organismo y más capaces de

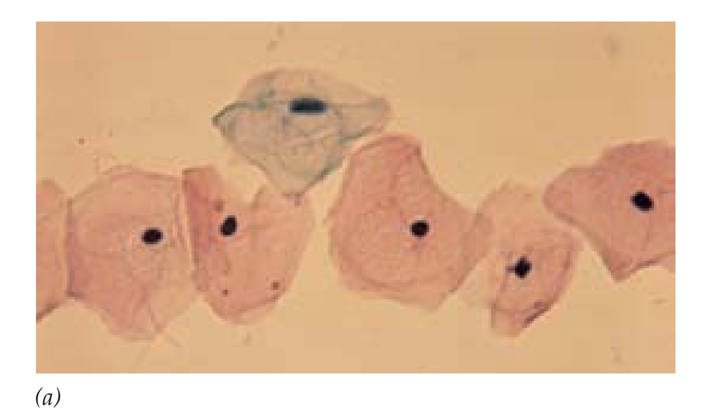
invadir tejidos normales. Según este concepto, la *tumorigénesis* requiere que la célula que inicia el cáncer sea capaz de experimentar un gran número de divisiones celulares. Este requerimiento ha hecho que se ponga mucha atención en los tipos de células presentes en un tejido que podrían tener el potencial de convertirse en tumorales.

Los tumores sólidos más comunes (como los de mama, colon, próstata y pulmón) surgen en tejidos epiteliales que de manera normal experimentan un nivel relativamente alto de división celular. Lo mismo es válido para las leucemias, que se desarrollan en tejidos formadores de sangre en rápida división. Las células de estos tejidos pueden clasificarse de manera aproximada en tres grupos: a) células madre, con potencial de proliferación ilimitado, que tienen la capacidad de producir más células iguales, y dar origen a todas las células del tejido (pág. 18); b) células progenitoras, que se derivan de células madre y poseen capacidad limitada de proliferar, y c) los productos finales diferenciados del tejido, que por lo general han perdido la capacidad de dividirse. En la figura 17-5 se presentan ejemplos de estos tres grupos.

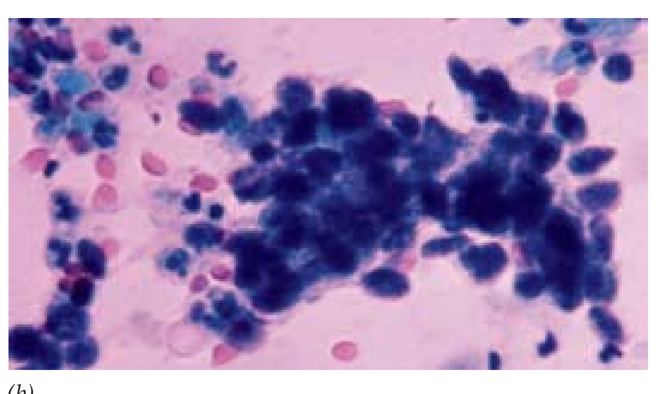
Dado el hecho de que la formación de un tumor requiere que una célula sea capaz de dividirse extensamente, se han considerado dos escenarios generales para el origen de los tumores. En un escenario, el cáncer surge de una población relativamente pequeña de células madre que habitan dentro de cada tejido adulto. Dadas su larga vida y su potencial de división ilimitado, las células madre tienen la oportunidad de acumular las mutaciones requeridas para la transformación maligna. Varios estudios sugieren que las células madre son el origen de diferentes tipos de tumores. En otro escenario, las células progenitoras "comprometidas" pueden dar origen a tumores malignos al adquirir determinadas propiedades, como la capacidad de proliferación ilimitada, como parte del proceso de progresión tumoral. Estos dos escenarios no se excluyen mutuamente, ya que algunos tumores bien pueden surgir de células madre y otros pueden hacerlo de la población de células progenitoras comprometidas.

A medida que el cáncer crece, las células de la masa tumoral se someten a un tipo de selección natural que propicia la acumulación de células con propiedades más favorables para el crecimiento tumoral. Por ejemplo, sólo las neoplasias que contienen células que mantienen la longitud de sus telómeros son capaces de sostener un crecimiento ilimitado (pág. 505). Cualquier célula que aparezca dentro de un tumor que exprese telomerasa tiene una enorme ventaja de crecimiento sobre las demás células que no expresan esta enzima. Con el tiempo proliferan las células que expresan la telomerasa, mientras que aquellas que no cuentan con la enzima mueren hasta que todas las células del tumor contienen telomerasa. La expresión de tal enzima ilustra otra característica importante de la progresión tumoral; no todos estos cambios se deben a una mutación genética. La activación de la expresión de telomerasa puede considerarse un cambio epigenético, uno que se debe a la activación de un gen reprimido en condiciones normales. Como se explica en el capítulo 12, es probable que este tipo de proceso de activación implique un cambio en la estructura de la cromatina en y alrededor del gen o un cambio en el estado de la metilación del DNA, o ambas cosas. Una vez que se produce el cambio epigenético, se transmite a toda la progenie de esa célula y, por consiguiente, representa una alteración heredable y permanente. Incluso después de convertirse en malignas, las células cancerosas no dejan de acumular mutaciones y cambios epigenéticos que las torna cada vez más anormales (como resulta evidente en la figura 16-5). Esta inestabilidad genética hace que la enfermedad sea difícil de tratar con la quimioterapia convencional porque a menudo surgen células dentro de la masa tumoral resistentes al fármaco.

Los cambios genéticos que ocurren durante la progresión tumoral a menudo se acompañan de cambios histológicos, esto es, cambios en el aspecto de las células. Los cambios iniciales con frecuencia producen células que pueden identificarse como "precancerosas", lo cual indica que han adquirido algunas de las propiedades de una célula cancerosa, como la pérdida de determinados controles de la proliferación, pero carecen de la capacidad de invadir tejidos normales o metastatizarse. El *frotis de Papanicolaou* es una prueba para detectar células precancerosas en el recubrimiento epitelial del cuello uterino. El desarrollo de cáncer cervical casi siempre progresa durante más de 10 años y se distingue por células cada vez más anormales (menos diferenciadas que las células normales, con núcleos más grandes, como se ve en la figura 16-7). Cuando se detectan células con apariencia anormal, el sitio precanceroso del cuello uterino puede



(a)



(b)

FIGURA 16-7 Detección de células anormales (premalignas) en un extendido de Papanicolaou. *a*) Células epiteliales escamosas normales del cuello uterino. Las células tienen una morfología uniforme con núcleo central y pequeño. *b*) Células anormales de una tumoración in situ, un cáncer preinvasivo del cuello uterino. Las células tienen formas heterogéneas y núcleos grandes. (Micrografías de © Vu/Cabisco/Visuals Unlimited.)

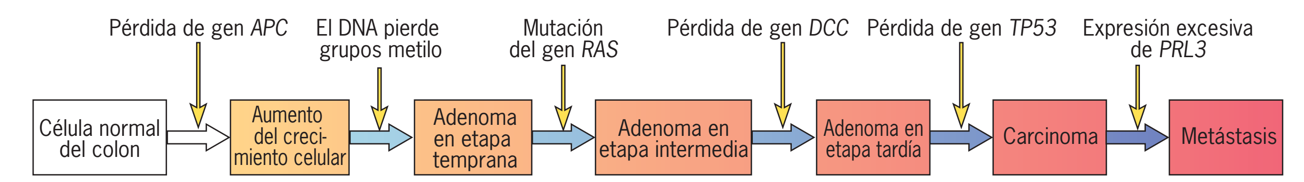


FIGURA 16-8 Una de varias secuencias posibles de cambios genéticos en un linaje celular que puede conducir al desarrollo de cáncer de colon. Las funciones de la mayoría de los genes se explican más adelante en el capítulo.

localizarse y destruirse con láser, congelamiento o intervención quirúrgica. Algunos tejidos a menudo generan tumores *benignos*, que contienen células las cuales han proliferado para formar una masa con pocas probabilidades de hacerse maligna. Las molas (lunares) que todo el mundo posee son un ejemplo de tumores benignos. Estudios recientes indican que las células pigmentarias que constituyen una mola experimentan una respuesta que las hace entrar en un estado de detención permanente de la división, llamado *senescencia*. Al parecer ésta es inducida en las células pigmentarias después de que han sufrido algunos de los cambios genéticos que en otras circunstancias las harían convertirse en malignas. Este concepto de "senescencia forzada" podría representar otra vía que ha surgido en la evolución para restringir el desarrollo de cáncer en los organismos superiores.

Como resulta evidente en la siguiente descripción, los genes que intervienen en la carcinogénesis constituyen un subgrupo específico del genoma cuyos productos participan en actividades tan diversas como la progresión de la célula por el ciclo celular, la adhesión de las células a sus vecinas, apoptosis y reparación del daño del DNA. Los distintos tipos de cáncer casi siempre tienen una combinación diferente de genes mutados, aunque están afectadas muchas de las mismas vías celulares. Sin embargo, incluso en un mismo tipo de cáncer hay una gran variabilidad entre los genes particulares que suelen mutar. En términos genéticos, el cáncer mejor definido es el del colon, en el que distintos genes tienden a mutar en las diversas etapas del desarrollo tumoral (fig. 16-8).[2] Se encuentran mutaciones en el gen *APC* en más de 60% de los adenomas (pólipos) benignos más pequeños del colon, lo que sugiere que la mutación en este gen se presenta con frecuencia como un primer paso en el desarrollo del cáncer de colon (fig. 16-8). En cambio, el gen *TP53* tiende a mutar sólo en etapas avanzadas de la evolución. Las células de cáncer metastásico de colon, que se encuentran en la última etapa de progresión del cáncer, tienen niveles altos de expresión del gen *PRL3*, que codifica una tirosinfosfatasa. *PRL3* se expresa en niveles mucho menores en las células anteriores a la metástasis. Las funciones de los genes *APC* y *TP53* se describen más adelante en este capítulo; la función de *PRL3* se desconoce.

En el último decenio se desarrolló una nueva tecnología para analizar la expresión génica que algún día podría tener un efecto considerable en la forma en que se diagnostica y trata el cáncer. Esta tecnología, que emplea microfragmentos de DNA (o chips de DNA), se describe con detalle en la página 515. En pocas palabras, se prepara una laminilla de vidrio que contiene unas cuantas a miles de manchas de DNA y cada mancha contiene el DNA correspondiente a un solo gen conocido. En la microserie puede incluirse cualquier grupo particular de genes, como los que se cree que participan en el crecimiento y la división, o los que al parecer provocan el desarrollo y diferenciación de los linfocitos o algún otro tipo celular. Una vez preparado, la microserie se incuba con cDNA con marca fluorescente sintetizado a partir de los mRNA de una población particular de células, como las de una masa tumoral que se extrajo durante una operación, o de células sanguíneas cancerosas de un paciente con leucemia. Los cDNA con marca fluorescente forman híbridos con las manchas de DNA complementario inmovilizado en la laminilla y el análisis posterior del patrón de fluorescencia informa a los investigadores cuáles mRNA están presentes en las células tumorales y su abundancia relativa dentro de la población de RNA mensajero.

Los estudios con microseries de DNA mostraron que los perfiles de expresión génica pueden suministrar información invaluable sobre las propiedades de un tumor. Por ejemplo, se ha reconocido que: a) la progresión de un tumor se relaciona con un cambio en la expresión de genes particulares; b) se pueden distinguir los distintos tipos de cáncer con base en sus perfiles de expresión génica; c) el perfil de expresión génica de un tumor específico puede revelar la agresividad probable (letalidad) de un tumor específico, y d) el perfil de expresión génica de un tumor específico puede arrojar indicios sobre la forma terapéutica con mayor probabilidad de inducir regresión del tumor. Estos aspectos se pueden revisar con más detalle.

La figura 16-9 muestra los niveles en los que se encontraron transcritos 50 genes diferentes en dos tipos distintos de leucemia, la leucemia linfoblástica aguda (ALL) y la leucemia mieloide aguda (AML). Los genes usados en esta figura (sus nombres aparecen al lado derecho) representan a aquellos cuya transcripción mostró la mayor diferencia entre estos dos tipos de cánceres sanguíneos. Cada columna representa los resultados de un solo paciente con ALL o AML, de manera que las columnas permiten comparar las similitudes en la expresión del gen entre un sujeto y otro. Los niveles de expresión génica se indican con color desde el azul oscuro (nivel más bajo) hasta el rojo oscuro (nivel más alto). La mitad superior de la figura identifica a los genes que se transcriben con un nivel mucho mayor en las células de ALL, mientras que la mitad inferior señala los genes que se transcriben con un nivel mucho más alto en las células de AML. Estos estudios aportan evidencia de que hay muchas diferencias en la expresión génica entre distintos tipos de tumores. Algunas de estas divergencias pueden relacionarse con las diferencias biológicas entre los tumores; una de ellas deriva de una progenitora mieloide y la otra de una progenitora

[2] En este capítulo, que trata sobre todo de la biología humana, se sigue una convención cada vez más usual: los genes humanos se escriben con letras mayúsculas (p. ej., *APC*), los genes de ratones con la letra inicial mayúscula (p. ej., *Brca1*) y los genes víricos con minúsculas (p. ej., *src*).

linfoide (véase fig. 17-5). No obstante, la mayoría de las diferencias son inexplicables. Por ejemplo, ¿por qué el gen que codifica la catalasa (el último gen de la lista) se expresa en un nivel bajo en la ALL y en uno elevado en la AML? Aun si estos estudios no pueden responder a esta pregunta, proporcionan a los investigadores una lista de los genes que deben considerarse más como blancos potenciales para los fármacos terapéuticos.

Cuanto más pronto se descubra el cáncer, es más probable que la persona pueda curarse; este es uno de los principios cardinales del tratamiento contra el cáncer. Incluso así, cierto

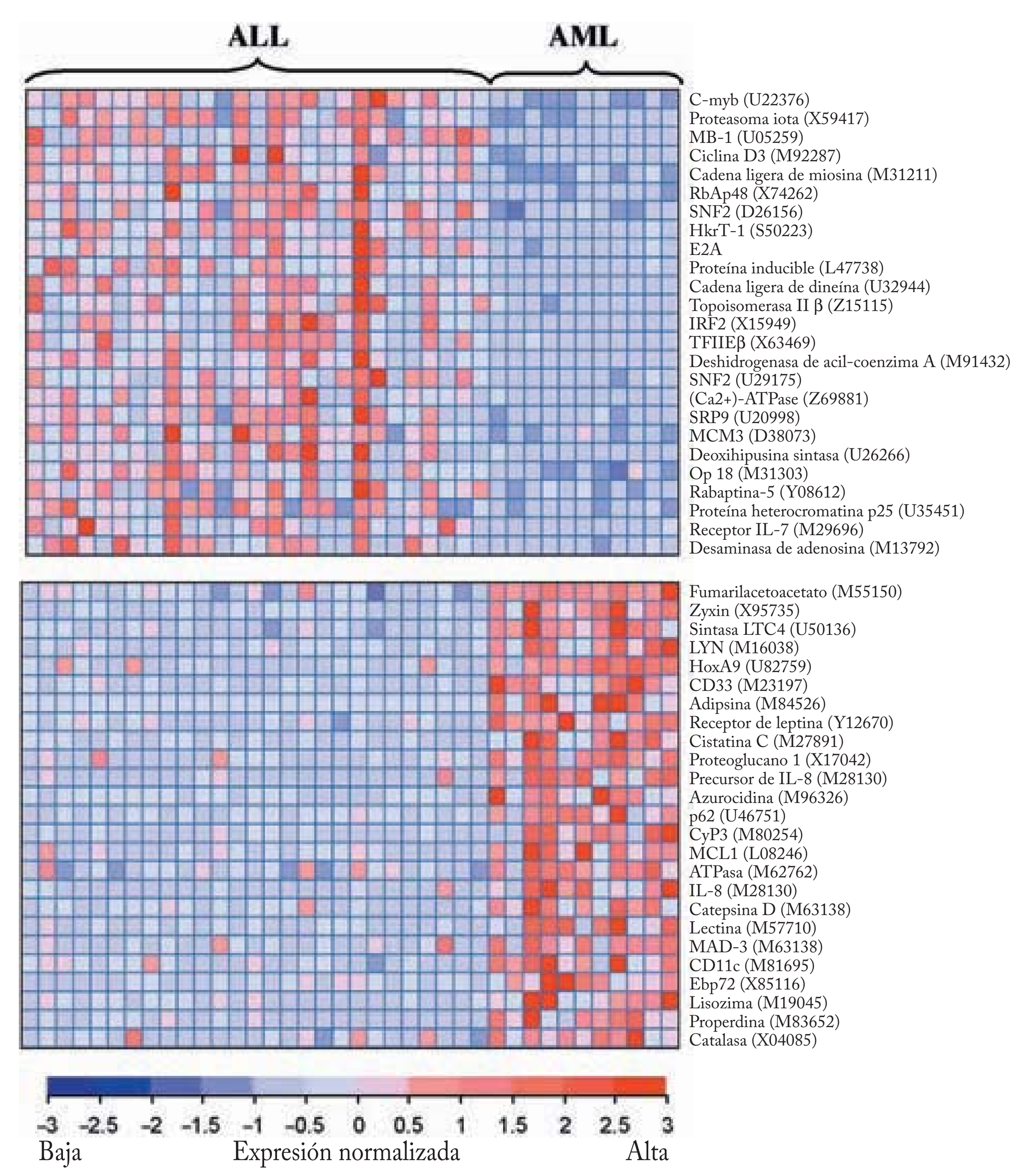


FIGURA 16-9 Perfil de expresión génica que distingue dos tipos de leucemia. Cada fila muestra el nivel de expresión de un solo gen cuyo nombre aparece a la derecha de la fila. Se indican los niveles de expresión de 50 genes distintos. La clave de color se muestra en el fondo de la figura e indica que el nivel más bajo de expresión es el azul oscuro y el más alto el rojo intenso. Cada columna representa los datos de una muestra (paciente) diferente. Las columnas de la izquierda muestran los perfiles de expresión de personas con leucemia linfoblástica aguda (ALL), mientras que las columnas de la derecha señalan los perfiles de expresión de individuos con leucemia mieloide aguda (AML) (indicadas por las llaves en la parte superior). Resulta evidente que los genes del cuadro superior se expresan con un nivel mucho mayor en los sujetos con ALL, mientras que los genes del cuadro inferior se expresan en un nivel mucho más alto en pacientes con AML. (Los genes incluidos en la figura se eligieron por estas diferencias en la expresión entre ambas enfermedades.) (Tomada de T. R. Golub et al., Science 286:534, 1999; © 1999 American Association for the Advancement of Science.)

porcentaje de tumores resulta fatal, pese a que se reconocen y extirpan en una etapa temprana. Por ejemplo, parece que algunos tipos de cáncer mamario en etapas tempranas liberan células capaces de iniciar la formación de tumores secundarios (metástasis) en sitios distantes, mientras que otros no. Estas diferencias determinan el pronóstico del paciente. En un estudio fundamental realizado en 2002 se encontró que es probable que se descubra el pronóstico de un determinado cáncer mamario según sea el nivel de expresión de unos 70 genes de entre los miles que se estudiaron en microseries de DNA (fig. 16-10). Este hallazgo tiene aplicaciones clínicas de importancia para guiar el tratamiento de personas con cáncer mamario. Las mujeres con tumores en etapa temprana que tienen un perfil de "mal pronóstico" con base en el patrón de expresión génica (fig. 16-10*a*) pueden recibir tratamiento agresivo con quimioterapia para maximizar la prevención posible de tumores secundarios. En la práctica actual no es probable que estas personas reciban algún tipo de quimioterapia porque no hay indicación de que el tumor se haya diseminado, según los criterios convencionales. Por el contrario, las mujeres cuyos tumores tienen un perfil de "buen pronóstico" podrían ahorrarse los agentes quimioterápicos más debilitantes, aun cuando sus tumores parezcan más avanzados (fig. 16-10*b*). En años recientes, varias compañías han lanzado pruebas de laboratorio para analizar los perfiles de

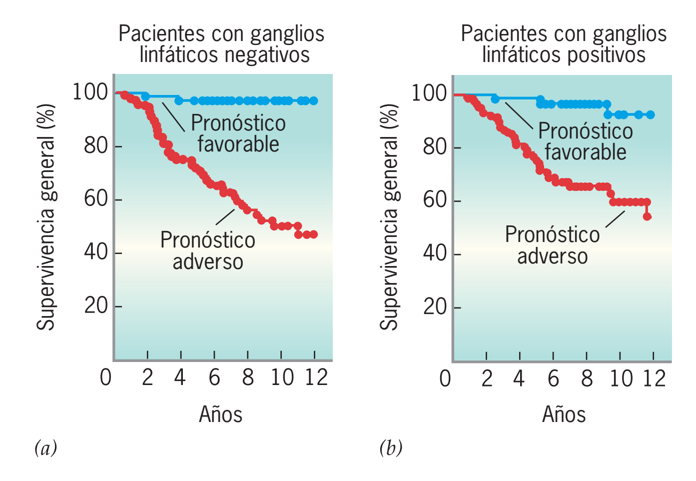


FIGURA 16-10 Uso de los datos de una microserie de DNA para elegir el tratamiento. Cada gráfica muestra el índice de supervivencia respecto del tiempo de pacientes con cáncer mamario que tenían buen o mal pronóstico, de acuerdo con el nivel de expresión de 70 genes seleccionados. Las pacientes de (*a*) no mostraron evidencia visible de que el cáncer se diseminara a los ganglios linfáticos cercanos al momento de la intervención quirúrgica. Como se indica en la gráfica: 1) no todas estas personas sobrevivieron y 2) la probabilidad de supervivencia puede predecirse en gran medida por los perfiles de expresión génica de sus tumores. Esto permite a los médicos tratar a las pacientes con mal pronóstico en forma más agresiva en comparación con aquellas con buen pronóstico. Los individuos en (*b*) revelaron evidencia visible de diseminación de células cancerosas a los ganglios linfáticos cercanos. Como se indica en la gráfica, la probabilidad de sobrevivir en este grupo también puede predecirse con los datos de la expresión génica. En condiciones normales, todos los sujetos de este grupo recibirían tratamiento muy agresivo, que tal vez no sea necesario para los que tienen buen pronóstico. (Tomada de M. J. van de Vijver et al., New Engl J Med 347:2004-2005, 2002. © 2002, Massachusetts Medical Society.)

expresión génica de cánceres de mama individuales en un intento de ayudar a determinar el mejor curso de tratamiento para estas pacientes. La validez de tales pruebas se evalúa actualmente en grandes ensayos clínicos. Se espera que al final los perfiles de expresión génica puedan usarse para mejorar el diagnóstico y optimizar el tratamiento para sujetos individuales con todos los tipos de cáncer.

Genes supresores de tumor y oncogenes: frenos y aceleradores

Los genes que intervienen en la carcinogénesis se dividen en dos grandes categorías: genes supresores de tumores y oncogenes. Los **genes supresores de tumores** actúan como frenos celulares, codifican proteínas que restringen el crecimiento celular y previenen la transformación maligna de las células (véase fig. 16-11*a*). La existencia de estos genes se descubrió en los estudios de finales del decenio de 1960 en los que se fusionaron células normales y malignas de roedor. Algunas de las células híbridas que se formaron en este tipo de fusión perdieron sus características malignas, lo que sugiere que una célula normal tiene factores que pueden suprimir el crecimiento descontrolado de una célula cancerosa. Se acumularon más datos de la existencia de genes supresores de tumores con las observaciones de que regiones específicas de algunos cromosomas particulares siempre se eliminan en células de ciertos tipos de cáncer. Si la ausencia de tales genes se vincula con el desarrollo de un tumor, entonces se infiere que la presencia normal de estos genes suprime la formación de neoplasias.

Por otro lado, los **oncogenes** codifican proteínas que promueven la pérdida del control de crecimiento y la conversión de una célula a su estado maligno (fig. 16-11*b*). La mayoría de los oncogenes actúa como aceleradores de la proliferación celular, pero también tienen otras funciones. Los oncogenes pueden ocasionar inestabilidad genética, impedir que una célula se vuelva víctima de la apoptosis o promover la metástasis. La existencia de oncogenes se descubrió mediante una serie de investigaciones con virus tumorales de RNA que se documenta en la sección Vías experimentales al final de este capítulo. Estos virus transforman una célula normal en una maligna porque tienen un oncogén que codifica una proteína que interfiere con las actividades normales de la célula. El momento crucial en estos estudios llegó en 1976, cuando se descubrió que un oncogén llamado *src*, portado por un virus tumoral de RNA denominado virus del sarcoma aviar, estaba en realidad presente en el genoma de las células no infectadas. De hecho, el oncogén no era un gen vírico, sino un gen celular que se había incorporado en el genoma viral durante una infección previa. Pronto se hizo evidente que las células tienen diversos genes, ahora conocidos como **protooncogenes**, con la capacidad de corromper las propias actividades celulares y conducirlas hacia el estado maligno.

Como se explica más adelante, los protooncogenes codifican proteínas que tienen varias funciones en las actividades *normales* de la célula. Los protooncogenes pueden convertirse en oncogenes (*activarse*) por varios mecanismos (fig. 16-12):

1. El gen puede mutar de tal manera que altere las propiedades del producto del gen para que ya no funcione en forma normal (fig. 16-12, vía a).

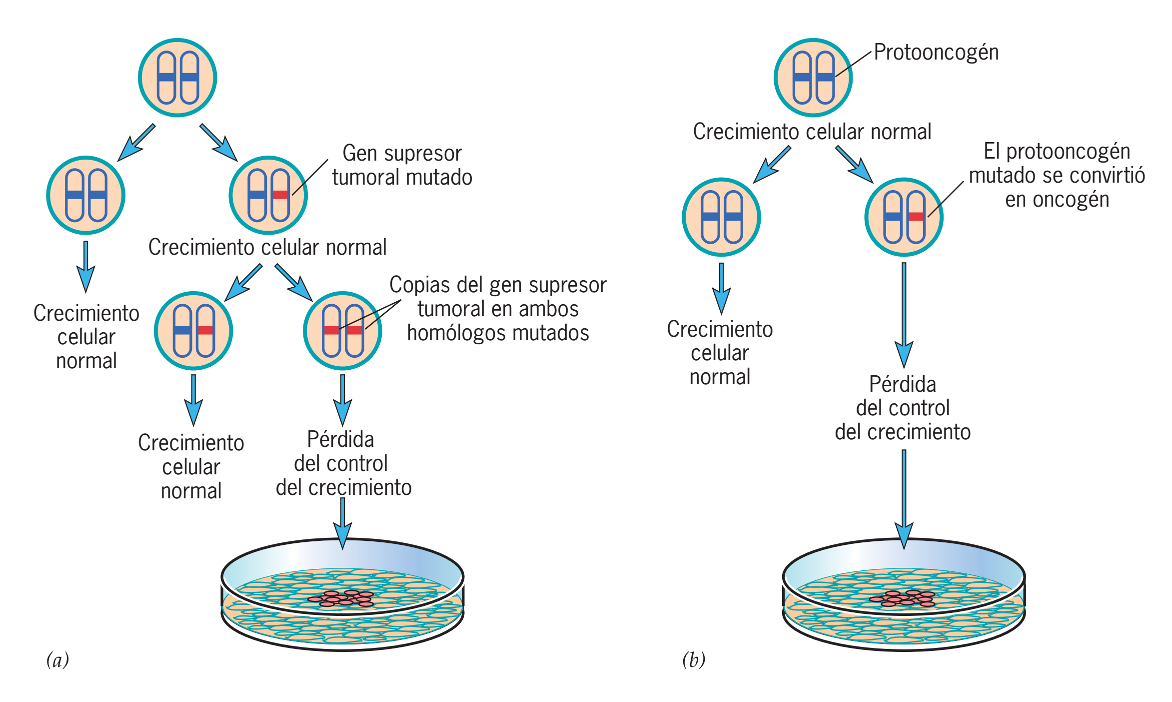


FIGURA 16-11 Efectos contrastantes de las mutaciones en los genes supresores de los tumores (*a*) y los oncogenes (*b*). Mientras que una mutación en una de las dos copias (alelos) de un oncogén puede ser suficiente para hacer que la célula pierda el control del crecimiento, para inducir el mismo efecto deben eliminarse ambas copias de un gen supresor tumoral. Como se explica un poco más adelante, los oncogenes surgen de protooncogenes como efecto de mutaciones con ganancia de función, esto es, mutaciones que hacen que el producto del gen tenga nuevas funciones que conducen a la transformación maligna. Por el contrario, los genes supresores tumorales sufren mutaciones con pérdida de función o desactivación epigenética que los vuelven incapaces de limitar el crecimiento celular.

Proteína codificada con estructura o función alterada
Mutación o deleción
Región reguladora
Proto-oncogén
a
b
c
Duplicación génica
Aumento de síntesis de proteína codificada
Proteína codificada por protooncogén
O bien
Una secuencia reguladora de DNA translocada desde un sitio distante altera la expresión del gen corriente abajo
Aumento de la síntesis de la proteína codificada
Síntesis de una proteína que contiene porciones codificadas por distintos genes. La proteína de fusión ya no está bajo el control normal
Un gen codificador de proteína translocado desde un sitio distante se fusiona con la porción del gen y causa la formación de un gen de fusión

FIGURA 16-12 Activación de un protooncogén a un oncogén. La activación puede realizarse de varias maneras, como se indica en esta figura. En la vía a, una mutación del gen altera la estructura y función de la proteína codificada. En la vía b, la amplificación del gen produce una expresión excesiva de éste. En la vía c, un reordenamiento del DNA pone un nuevo segmento de DNA cerca o junto al gen, lo que altera su expresión o la estructura de la proteína codificada.

2. El gen puede duplicarse una o más veces, lo que produce la amplificación y producción excesiva de la proteína codificada (fig. 16-12, vía b).
3. Puede haber un nuevo ordenamiento cromosómico que mueva una secuencia de DNA distante en el genoma hasta quedar próxima al gen, lo que modifica la expresión del gen o la naturaleza del producto génico (fig. 16-12, vía c).

Cualesquiera de estas alteraciones génicas puede hacer que una célula pierda capacidad de respuesta al control del crecimiento normal, lo cual hace que funcione como una célula maligna. Los oncogenes actúan de *manera dominante*, lo que significa que una sola copia de un oncogén puede hacer que la célula exprese el fenotipo alterado, sin importar que haya o no una copia normal inactivada del gen en el cromosoma homólogo (fig. 16-11*b*). Los investigadores han aprovechado esta propiedad para identificar a los oncogenes mediante la introducción del DNA sospechoso de contener el gen en células cultivadas para vigilar luego en busca de evidencia de alteración en las propiedades de crecimiento.

Ya se explicó antes que el desarrollo de un tumor maligno humano requiere más que una sola alteración genética. La razón se vuelve aparente cuando se comprende que hay dos tipos de genes causantes de la formación tumoral. Siempre que una célula tenga su complemento íntegro de genes supresores tumorales, se considera protegida contra los efectos de un oncogén por razones evidentes durante la explicación de estos genes más adelante. La mayoría de los tumores contienen alteraciones en los genes supresores de neoplasias y los oncogenes, lo que sugiere que la pérdida de una función supresora tumoral en la célula debe acompañarse de la conversión de un protooncogén en un oncogén antes que la célula se torne maligna. Incluso en ese caso, es posible que la célula no manifieste todas las propiedades necesarias para invadir a los tejidos circundantes o formar colonias secundarias por metástasis. Se requieren mutaciones en genes adicionales, como los que codifican a las moléculas de adhesión celular o las proteasas extracelulares (descritas en la página 206), para que estas células adquieran un fenotipo completo que ponga en riesgo la vida. Por ejemplo, los estudios de cáncer colorectal indican que se necesitan mutaciones hasta en siete genes diferentes para el desarrollo de un tumor por completo maligno. En 2005, el *National Cancer Institute* lanzó la fase inicial de una polémica iniciativa a 10 años con costo de 1 500 millones de dólares llamada Proyecto Genoma del Cáncer Humano, cuyo objetivo es identificar todas las mutaciones y alteraciones genómicas comunes que ocurren en una amplia variedad de tipos de cáncer. La meta final es secuenciar los genomas de muestras tumorales de alrededor de 12 500 pacientes. Se espera que el proyecto descubra un nuevo conjunto de blancos antes desconocidos para usarlos en diagnóstico, clasificación y tratamiento de esas enfermedades.

Ahora se pueden considerar las funciones de los productos que codifican los genes supresores tumorales y los oncogenes, además de examinar cómo las mutaciones en estos genes pueden hacer que una célula se vuelva maligna.

Genes supresores de tumores La transformación de una célula normal en una cancerosa se acompaña de la pérdida de la función de uno o más genes supresores tumorales. Por ahora hay cerca de dos docenas de genes referidos como supresores tumorales en los seres humanos, algunos de los cuales se listan en el cuadro 16-1. Entre los genes de la lista se incluyen los que codifican factores de transcripción (p. ej., *TP53* y *WT1*), reguladores del ciclo celular (p. ej., *RB* y *p16*), componentes que regulan las vías de señalización (*NF1*), una fosfatasa de fosfoinosítido (*PTEN*) y una proteína que regula la elongación y degradación proteica (*VHL*). De una u otra manera, casi todas las proteínas que codifican los genes supresores tumorales actúan como reguladores negativos de la proliferación celular, razón por la cual su eliminación promueve el crecimiento celular descontrolado. Los productos de los genes supresores tumorales también ayudan a mantener la estabilidad genética, lo cual puede ser una razón primordial por la que los tumores contienen cariotipos tan anormales (fig. 16-5). Algunos genes supresores tumorales partici-

Cuadro 16-1 Genes supresores de tumores

Gen	Tumor primario	Función propuesta	Síndrome heredado
APC	Colorrectal	Se une con la catenina beta y actúa como factor de transcripción	Poliposis adenomatosa familiar
ARF	Melanoma	Activación de p53 (antagonista de MDM2)	Melanoma familiar
BRCA1	Mamario	Reparación de DNA	Cáncer mamario familiar
MSH2, MLH1	Colorrectal	Reparación de discrepancia	HNPCC
E-Cadherina	Mamario, colónico, etc.	Molécula de adhesión celular	Cáncer gástrico familiar
INK4a	Melanoma, pancreático	Inhibidor de p16:Cdk $p14^{ARF}$: estabiliza a p53	Melanoma familiar
NF1	Neurofibromas	Activa la GTPasa de Ras	Neurofibromatosis tipo 1
NF2	Meningiomas	Vincula la membrana con el citoesqueleto	Neurofibromatosis tipo 2
p16 (MTS1)	Melanoma	Inhibidor de Cdk	Melanoma familiar
TP53	Sarcomas, linfomas, etc.	Factor de transcripción (ciclo celular y apoptosis)	Síndrome de Li-Fraumeni
PTEN	Mamario, tiroideo	Fosfatasa PIP_3	Enfermedad de Cowden
RB	Retiniano	Se une con E2F (regulación de transcripción en el ciclo celular)	Retinoblastoma
VHL	Renal	Elongación y degradación proteica	Síndrome de von Hippel-Lindau
WT1	Tumor de Wilms renal	Factor de transcripción	Tumor de Wilms

pan en el desarrollo de una gran variedad de distintos tipos de cáncer, mientras que otros intervienen en la formación de uno o algunos tipos de cáncer.

Es de todos sabido que los miembros de algunas familias tienen un riesgo elevado para desarrollar ciertos tipos de cáncer. Aunque estos síndromes cancerosos hereditarios son raros, proporcionan una oportunidad sin precedentes para identificar genes supresores de tumores que, en caso de ausencia, contribuyen al desarrollo de formas hereditarias y esporádicas (no hereditarias) de cáncer. El primer gen supresor tumoral que se estudió y al final se clonó (y uno de los más importantes) se relaciona con un raro cáncer infantil de la retina, el *retinoblastoma*. El gen causante de este trastorno se conoce como *RB*. La incidencia del retinoblastoma sigue dos patrones distintos: a) ocurre con gran frecuencia y en edades tempranas en los miembros de ciertas familias y b) se presenta en forma esporádica a una edad mayor entre miembros de la población en general. El hecho de que el retinoblastoma aparezca en ciertas familias sugiere que el cáncer puede heredarse. El examen de las células de niños que sufren retinoblastoma reveló que un miembro del par decimotercero de cromosomas homólogos carecía de una pequeña parte de la porción interior del cromosoma. La deleción se encontraba en todas las células de los niños, en las del cáncer retiniano y las de otras partes del cuerpo, lo que indicaba que la alteración cromosómica se heredó de alguno de los padres.

El retinoblastoma se hereda como un rasgo genético dominante porque los miembros de las familias con alto riesgo que desarrollan la enfermedad heredan un alelo normal y uno anormal. No obstante, a diferencia de la mayoría de los trastornos dominantes, como la enfermedad de Huntington, en la que los individuos que heredan un gen faltante o alterado siempre desarrollan la enfermedad, los niños que heredan un cromosoma sin el gen del retinoblastoma tienen una predisposición marcada para desplegar el tumor, en lugar de heredar el trastorno como tal. De hecho, cerca de 10% de los individuos que heredan un cromosoma con una deleción *RB* nunca desarrollan cáncer de la retina. ¿Cómo es que un pequeño porcentaje de estos sujetos predispuestos escapa a la enfermedad?

En 1971, Alfred Knudson de la *Texas University* explicó la base genética del retinoblastoma; propuso que el desarrollo del retinoblastoma requiere la mutación o eliminación de ambas copias del gen *RB* de una célula retiniana para que la célula pueda dar origen a un retinoblastoma. En otras palabras, el cáncer surge como resultado de dos "golpes" independientes en una sola célula. En casos de retinoblastoma esporádico, el tumor se desarrolló a partir de una célula retiniana en la que ambas copias del

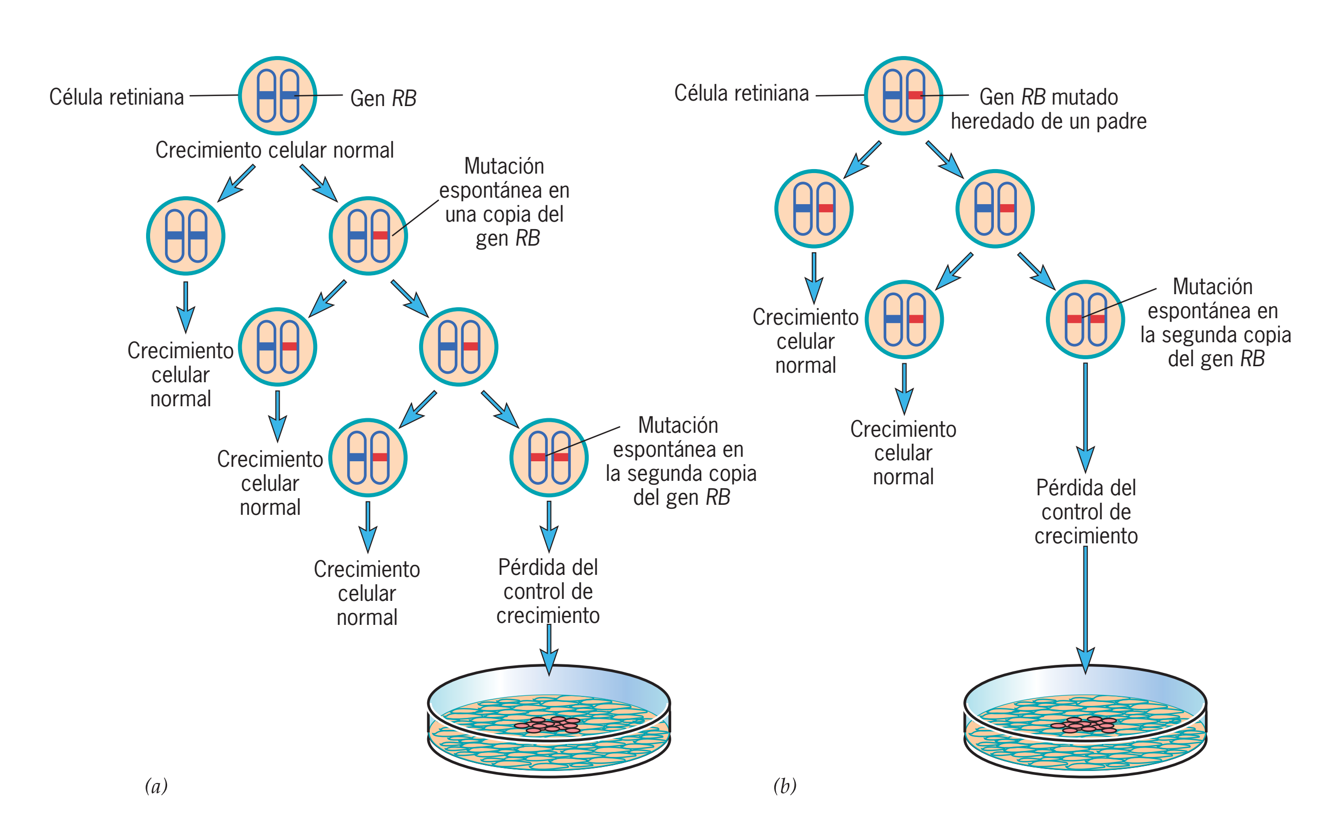


FIGURA 16-13 Mutaciones en el gen *RB* que pueden conducir al retinoblastoma. *a*) En casos esporádicos (no familiares) de la enfermedad, un individuo comienza su vida con dos copias normales del gen *RB* en el cigoto y el retinoblastoma se desarrolla sólo en los raros sujetos en los que una célula retiniana determinada acumula mutaciones independientes en ambos alelos del gen. *b*) En los casos familiares (hereditarios) de la enfermedad, una persona comienza su vida con un alelo anormal del gen *RB*, casi siempre una deleción. Por lo tanto, todas las células de la retina tienen por lo menos uno de sus genes *RB* sin función. Si el otro alelo *RB* en una célula retiniana se desactiva, las más de las veces como resultado de una mutación puntual, esa célula da origen a un tumor retiniano.

gen *RB* sufrieron mutación espontánea sucesiva (fig. 16-13*a*). Como la probabilidad de que ambos alelos del mismo gen sean blanco de mutaciones debilitantes en la misma célula es extremadamente baja, la incidencia de cáncer en la población general es bajísima. En cambio, las células de una persona que hereda un cromosoma con una deleción de *RB* ya se encuentran a la mitad del camino de convertirse en malignas. Una mutación en el alelo *RB* restante en cualquiera de las células de la retina produce una célula que carece del gen *RB* normal y por tanto no puede crear un producto funcional del gen *RB* (fig. 16-11*b*). Esto explica por qué los individuos que heredan un gen *RB* anormal tienen una predisposición tan alta a desarrollar el cáncer. El segundo "golpe" no ocurre en cerca de 10% de estos sujetos y no desarrolla la anomalía. La hipótesis de Knudson se confirmó más tarde mediante el examen de las células de pacientes con una disposición hereditaria al retinoblastoma, en el que se encontró que ambos alelos del gen estaban alterados en las células cancerosas, como se había anticipado. Las personas con retinoblastomas esporádicos tienen células normales que carecen de mutaciones *RB* y células tumorales en las que ambos alelos del gen son anormales.

Aunque las deficiencias en el gen *RB* se manifiestan primero en el desarrollo de cánceres de la retina, este no es el final de la historia. Las personas que sufren la forma hereditaria del retinoblastoma también tienen un alto riesgo de desarrollar otros tipos de tumores en edades más avanzadas, sobre todo sarcomas de tejidos blandos (tumores de origen mesenquimatoso en lugar de epitelial). Las consecuencias de las mutaciones *RB* no se limitan a las personas que heredan un alelo mutante. Las mutaciones en los alelos *RB* son un fenómeno frecuente en los tipos esporádicos de cáncer de mama, próstata y pulmón entre individuos que heredaron dos alelos *RB* normales. Cuando las células de estos tumores se cultivan in vitro, la reintroducción de un gen *RB* de tipo nativo en las células es suficiente para suprimir su fenotipo canceroso, lo que indica que la pérdida de esta función génica contribuye en buena medida a la génesis tumoral. A continuación se revisa con más detalle el papel del gen *RB*.

El papel de pRb en la regulación del ciclo celular La importancia del ciclo celular en el crecimiento y proliferación de las células se trató en los capítulos 14 y 15, en los que se señaló que los factores que controlan el ciclo celular pueden tener un papel central en el desarrollo del cáncer. En su función mejor estudiada, la proteína que codifica el gen *RB*, *pRb*, ayuda a regular el paso de las células de la etapa G_1 del ciclo celular a la fase S, durante la cual se produce la síntesis del DNA. Como se explica en la página 574, la transición de la etapa G_1 a la S es un periodo de compromiso para la célula; una vez que la célula ingresa en la fase S, siempre continúa con el resto del ciclo celular y la mitosis. La transición de G_1 a S se acompaña de la activación de muchos genes diferentes que codifican proteínas, desde polimerasas de DNA hasta ciclinas e histonas. Entre los factores de transcripción que participan en la activación de los genes necesarios para las actividades de la fase S figuran miembros de la familia E2F de los factores de transcripción, que son blancos clave de pRb. El papel de pRb en el control de la actividad de E2F se ilustra en la figura 16-14. Durante G_1, las proteínas E2F se mantienen unidas con pRb, lo cual impide que activen varios genes que codifican proteínas necesarias para las actividades de la fase S (p. ej., ciclina E y polimerasa alfa de DNA). Los estudios sugieren (como indica el paso 1 de la figura 16-14) que el complejo E2F-pRb se relaciona con el DNA, pero actúa como represor génico y no como activador. A medida que se aproxima el final de la etapa G_1, la subunidad pRb del complejo pRb-E2F se fosforila por acción de las cinasas dependientes de ciclina que regulan la transición G_1-S. Una vez fosforilada, pRb libera el E2F unido, lo que permite que el factor de transcripción active la expresión génica y esto marca el compromiso irreversible de la célula para ingresar a la fase S. Se esperaría que una célula que pierde la actividad pRb como resultado de una mutación en *RB* perdiera su capacidad para desactivar a E2F, lo que eliminaría ciertas res-

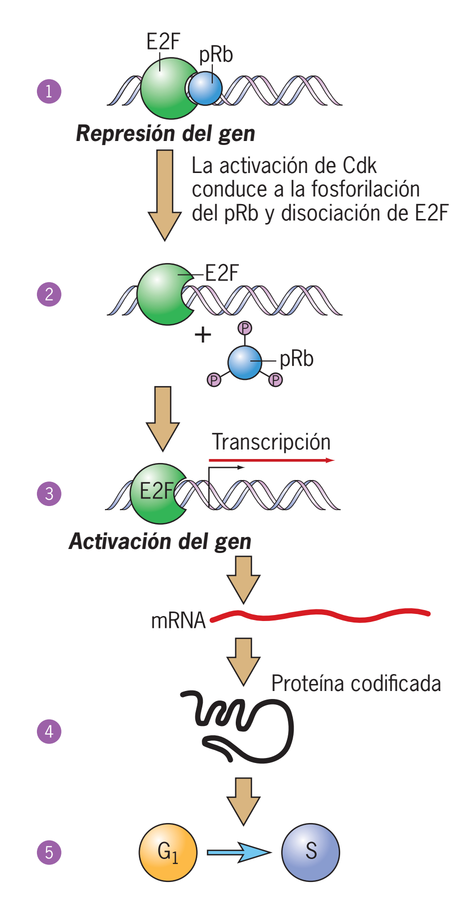


FIGURA 16-14 El papel de pRb en el control de la transcripción de genes necesarios para la progresión del ciclo celular. Durante la mayor parte de G_1, la pRb no fosforilada se une con la proteína E2F. El complejo E2F-pRb se une con sitios reguladores en las regiones promotoras de muchos genes referidos en la progresión del ciclo celular y actúa como represor transcripcional que bloquea la expresión génica. Es probable que la represión implique la metilación de la lisina 9 o la histona H3 que modula la configuración de la cromatina (pág. 498). La activación de la cinasa dependiente de ciclina (Cdk) conduce a la fosforilación de pRb, la cual ya no puede unirse con la proteína E2F (paso 2). En la vía representada aquí, la pérdida de la pRb unida convierte a la E2F unida con DNA en un activador de la transcripción, lo que conduce a la expresión de los genes que se regulan (paso 3). El mRNA se traduce en proteínas (paso 4) necesarias para la progresión de las células de G_1 a la fase S del ciclo celular (paso 5). Se han identificado otras funciones de pRb pero no se consideran aquí.

tricciones para la entrada a la fase S. E2F es sólo una de docenas de proteínas encargadas de unirse con pRb, lo que sugiere que pRb posee muchas funciones más. Otro hecho que indica la complejidad de las interacciones de pRb es que la proteína contiene por lo menos 16 residuos de serina y treonina que pueden fosforilarse por la acción de cinasas dependientes de ciclina. Es probable que la fosforilación de distintas combinaciones de residuos de aminoácidos permita a la proteína interactuar con diferentes blancos corriente abajo.

La importancia de pRb en la regulación del ciclo celular es demostrada por el hecho de que varios virus tumorales de DNA (incluidos adenovirus, virus del papiloma humano y SV40) codifican una proteína que se une con pRb, lo que bloquea su capacidad para unirse con E2F. La capacidad de estos virus para inducir cáncer en células infectadas depende de su capacidad para bloquear la influencia negativa que tiene pRb sobre la progresión de la célula por el ciclo celular. Al usar estas proteínas bloqueadoras de pRb, estos virus obtienen los mismos resultados que cuando se elimina el gen *RB*, lo que conduce al desarrollo de tumores en los seres humanos.

El papel de p53: guardián del genoma A pesar de su discreto nombre, es posible que el gen *TP53* tenga más nexos con el desarrollo del cáncer humano que cualquier otro componente del genoma. El gen obtiene su nombre del producto que codifica, p53, un polipéptido con masa molecular de 53 000 daltones. En 1990, *TP53* se reconoció como un gen supresor tumoral, que en caso de faltar induce un raro trastorno hereditario llamado síndrome de Li-Fraumeni. Las personas con esta anormalidad tienen una incidencia muy alta de ciertos tipos de cáncer, como cáncer mamario, cerebral y leucemia. Al igual que los individuos con la forma hereditaria del retinoblastoma, los sujetos con síndrome de Li-Fraumeni heredan un alelo normal y otro anormal (o ausente) del gen supresor tumoral *TP53*, por lo que son muy susceptibles a los diferentes tipos de cáncer que se deben a las mutaciones aleatorias en el alelo normal.

La importancia de p53 como arma antitumoral resulta más evidente con el descubrimiento de que más de 50% de todos los tipos de cáncer en los humanos contienen células con mutaciones o deleciones puntuales en ambos alelos del gen *TP53*. Además, las neoplasias formadas por células que tienen mutaciones *TP53* se acompañan de un menor índice de supervivencia que aquellos que tienen el gen nativo *TP53*. Está claro que la eliminación funcional de *TP53* es un paso importante en la progresión de muchas células cancerosas hacia el estado maligno completo.

¿Por qué es tan importante la presencia de p53 para prevenir la transformación maligna de una célula? Como se explica en la página 578, p53 es un factor de transcripción que activa la expresión de una gran cantidad de genes referidos en la regulación del ciclo celular y la apoptosis. La importancia del cometido regulador de la transcripción de p53 es evidente en la figura 16-15, que muestra la localización de las seis mutaciones que más a menudo alteran p53 en cánceres humanos; todas ellas se mapean en la región de la proteína que interactúa con DNA. Uno de los genes mejor estudiados que activa p53 codifica una proteína llamada p21 que inhibe la cinasa dependiente de ciclina que impulsa a la célula por el punto de revisión de G_1. Cuando se eleva el nivel de p53 en la célula G_1 dañada, se activa la expresión del gen *p21* y se detiene el avance en el ciclo celular (véase fig. 14-9). Esto proporciona a la célula el tiempo necesario para reparar el daño genético antes de iniciar la replicación del DNA. Cuando ambas copias del gen *TP53* de una célula mutan y su producto ya no es funcional, la célula ya no puede producir el inhibidor p21 ni ejercer el control por retroalimentación que impide el inicio de la fase S cuando no está preparada para ésta. La falta de reparación del daño en el DNA da lugar a la producción de células anormales que tienen la capacidad de volverse malignas.

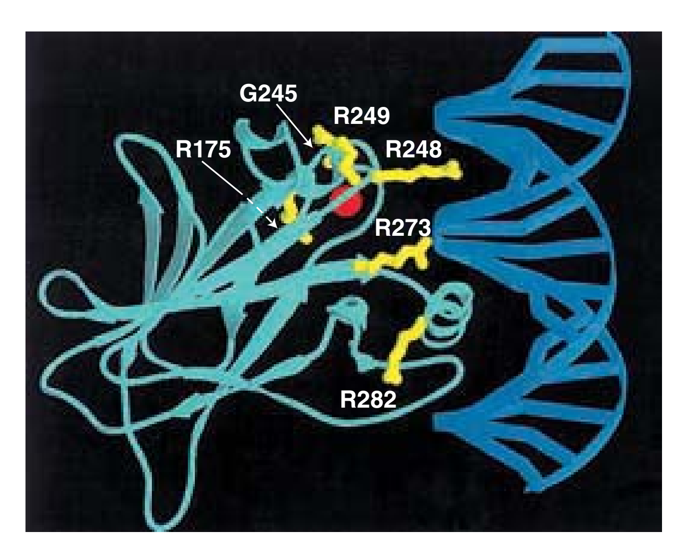


FIGURA 16-15 La actividad de p53 es especialmente sensible a las mutaciones en su dominio de unión a DNA. La proteína p53 consta de varios dominios con diferentes funciones. Se muestra un modelo de cinta del dominio de unión a DNA. Los seis aminoácidos que mutan con más frecuencia en las moléculas de p53 que han sido debilitadas en varios tipos de cáncer en humanos se indican con nomenclatura de una sola letra (fig. 2-26). Estos residuos se encuentran en la interfase proteína-DNA o cerca de ella. (Reimpresa con autorización de Y. Cho, S. Gorina, P. D. Jeffrey, N. P. Pavletich, Science 265:352, 1994; © 1994, American Association for the Advancement of Science.)

La detención del ciclo celular no es la única manera en que p53 protege a un organismo del cáncer. Una vía alternativa es que p53 puede dirigir a una célula con daño genético por una vía que termina en la muerte por apoptosis, lo que libra al cuerpo de las células con potencial maligno. Se cree que la proteína p53 realiza esta tarea mediante varias acciones, incluida la activación de la expresión del gen *BAX*, cuyo producto codificado (Bax) inicia la apoptosis (pág. 655).[3] Si se desactivaran ambos alelos de *TP53*, una célula con daño en el DNA no se destruye, aunque carezca de la integridad genética necesaria para mantener un crecimiento controlado (fig. 16-16). Cuando se reintroduce un gen *TP53* normal en una célula cancerosa que perdió ambos alelos *TP53*, la célula modificada por ingeniería genética sufre a menudo apoptosis.

[3] La proteína p53 también puede inducir apoptosis por un mecanismo que es independiente de su actividad promotora de la transcripción. Lo hace interactuando directamente con varios miembros de la familia Bcl-2 (véase fig. 15-36) en la membrana mitocondrial externa.

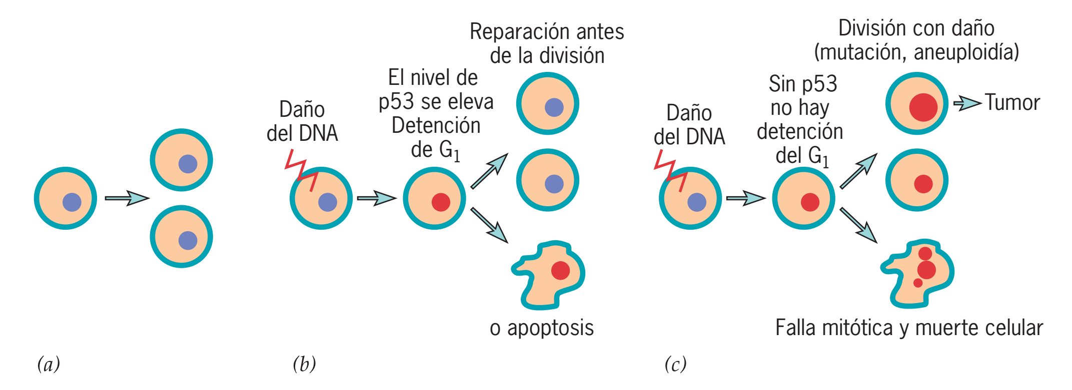


FIGURA 16-16 Un modelo de la función de p53. *a*) La división celular normal no requiere la participación de p53. *b*) Empero, si el DNA de una célula se daña como resultado de la exposición a mutágenos, el nivel de p53 se eleva y actúa para detener la progresión de la célula por G_1 o dirigir la célula hacia la apoptosis. *c*) Si se desactivan ambas copias de *TP53*, la célula pierde la capacidad para detener el ciclo celular o derivar la célula hacia la apoptosis después del daño del DNA. Como resultado, la célula muere por falla de la mitosis o continúa su proliferación con anormalidades genéticas, lo cual puede conducirla a la formación de una neoplasia maligna. (Tomada de D. P. Lane. Reimpresa con autorización de Nature 358:15, 1992. © 1992, Macmillan Magazines Ltd.)

El nivel de p53 en una célula sana en fase G_1 es muy bajo. Sin embargo, si una célula en G_1 sufre daño genético, como ocurre cuando la célula se somete a luz ultravioleta o carcinógenos químicos, la concentración de p53 se eleva con rapidez. Se puede inducir una respuesta similar tan sólo con la inyección de DNA con cadenas rotas en una célula. El aumento de los niveles de p53 no se debe a una mayor expresión del gen, sino a un descenso de la degradación de la proteína. La degradación de p53 se facilita por una proteína llamada MDM2, la cual se une con p53 y la escolta fuera del núcleo hacia el citosol. Una vez ahí, MDM2 agrega moléculas de ubiquitina a la molécula de p53, lo que conduce a su destrucción por un proteasoma (pág. 537). ¿De qué manera el daño del DNA conduce a la estabilización de p53? En la página 578 se explicó que las personas que sufren ataxia-telangiectasia carecen de una cinasa de proteína llamada ATM y son incapaces de reaccionar en forma adecuada a la radiación que daña el DNA. En condiciones normales, ATM se activa después del daño al DNA y p53 es una de las proteínas a las que ATM fosforila. La versión fosforilada de la molécula p53 ya no es capaz de interactuar con MDM2, lo cual estabiliza a las moléculas existentes de p53 en el núcleo y les permite activar la expresión de genes como *p21* y *BAX* (véase fig. 16-19).

Algunas células tumorales que se han encontrado, contienen un gen *p53* de tipo nativo, junto con copias adicionales de *MDM2*. Se cree que estas células producen cantidades excesivas de MDM2, lo cual impide que los niveles de p53 aumenten hasta las cifras necesarias para detener el ciclo celular o inducir la apoptosis después del daño en el DNA (u otros estímulos oncogénicos). Está en marcha un gran esfuerzo para desarrollar fármacos que bloqueen la interacción entre MDM2 y p53, en un intento de restaurar la actividad de p53 en células cancerosas que retienen este supresor tumoral clave. La relación entre MDM2 y p53 también se demostró con eliminaciones génicas. Los ratones que carecen de un gen que codifique MDM2 mueren en una etapa temprana del desarrollo, tal vez porque sus células sufren apoptosis dependiente de p53. Esta interpretación se apoya con el hallazgo de que los ratones que carecen de genes que codifican *tanto* MDM2 como p53 (eliminaciones dobles) sobreviven hasta la edad adulta pero están muy propensos a sufrir cáncer. Como estos embriones no pueden producir p53, no requieren una proteína como MDM2 que facilita la destrucción de p53. Tal observación ilustra un principio importante de la genética oncológica: aun cuando un gen "crucial" como *RB* o *TP53* carezca de mutaciones y deleciones, la función de ese gen puede afectarse por las alteraciones en otros genes cuyos productos sean parte de las mismas vías que el gen "crucial". En este caso, la expresión excesiva de MDM2 puede tener el mismo efecto que la ausencia de p53. Siempre que se bloquee una vía supresora de tumores, no es necesario que se altere el gen supresor tumoral mismo. Muchos estudios indican que deben desactivarse la vía de p53 y la de pRb, de una forma u otra, para permitir la progresión de la mayoría de las células tumorales.

A causa de su capacidad para iniciar la apoptosis, p53 tiene un papel central en el tratamiento del cáncer por radiación y quimioterapia. Durante muchos años se asumió que las células cancerosas son más susceptibles que las normales a los fármacos y la radiación porque las células malignas se dividen con más rapidez. Sin embargo, algunas células cancerosas se dividen con más lentitud que sus contrapartes normales y aun así son más sensibles a los fármacos y la radiación. Una teoría alternativa señala que las células normales son más resistentes a los fármacos o la radiación porque una vez que sufren daño genético detienen su ciclo celular hasta que se repara el daño o sufren apoptosis. En cambio, las células malignas con daño sostenido en el DNA tienen más probabilidad de sufrir apoptosis, siempre que posean un gen *TP53* funcional. Si las células malignas pierden la función p53, muchas veces no pueden dirigirse a la apoptosis y se vuelven muy resistentes a cualquier tratamiento adicional (fig. 16-17). Es probable que esta sea la razón principal por la que los tumores que carecen de un gen *TP53* funcional (p. ej., cánceres de colon, prostático y pancreático) reaccionan mucho menos a la radiación y la quimioterapia que los tumores con un

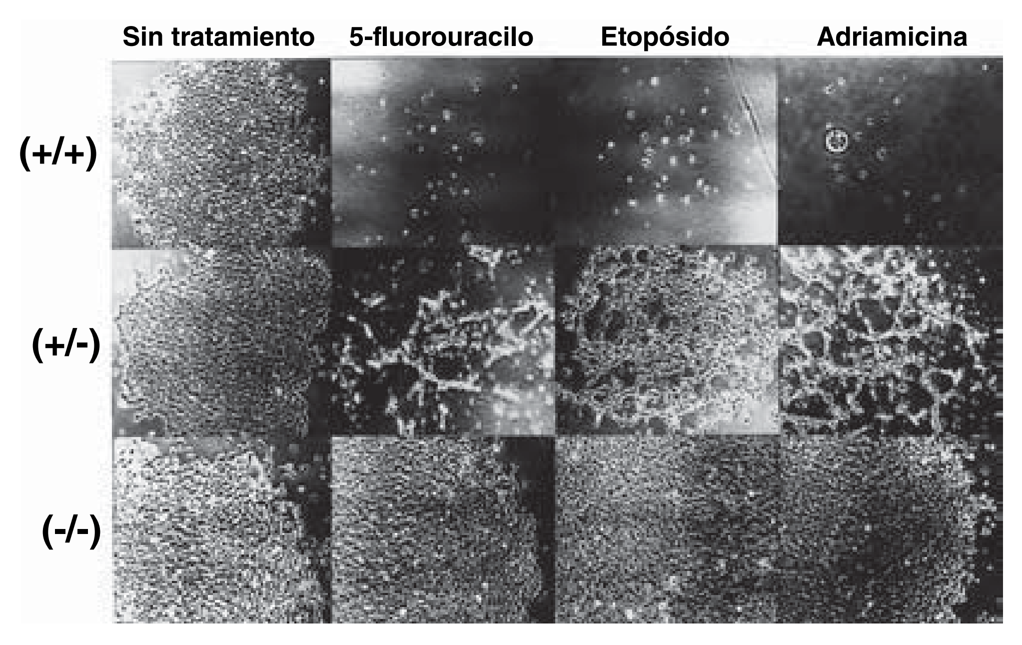


FIGURA 16-17 **Demostración experimental del papel de p53 en la supervivencia de las células tratadas con agentes quimioterápicos.** Las células se cultivaron a partir de ratones que tenían dos alelos funcionales del gen que codifica p53 (fila superior), un alelo funcional del gen (fila intermedia) o que carecían de un alelo funcional del gen (fila inferior). Cada uno de estos cultivos se realizó en ausencia de un agente quimioterápico (primera columna) o en presencia de uno de tres compuestos indicado en la parte superior de las otras tres columnas. Es evidente que los compuestos tuvieron un efecto drástico en la detención del crecimiento y la inducción de la muerte celular (apoptosis) en las células normales, mientras que las células que carecen de p53 continuaron su proliferación en presencia de estos compuestos. (Tomada de Scott W. Lowe, H. E. Ruley, T. Jacks y D. E. Housman, Cell 74:959, 1993; con autorización de Cell Press.)

tipo nativo del gen (p. ej., cáncer testicular y leucemias linfoblásticas agudas de la infancia).

Otros genes supresores de tumores Aunque las mutaciones en *RB* y *TP53* se acompañan de una gran variedad de tumores malignos en los seres humanos, las mutaciones en otros genes supresores tumorales se detectan sólo en unos cuantos tipos de cáncer.

La *poliposis adenomatosa colónica familiar* (*FAP*) es un trastorno hereditario en el que los individuos desarrollan cientos, incluso miles, de pólipos premalignos (adenomas) a partir de las células epiteliales que recubren la pared del colon (fig. 16-18). Si no se extirpan, es muy probable que las células de algunos de estos pólipos progresen hasta el estado maligno completo. Se descubrió que las células de los pacientes con este trastorno tienen una deleción de una pequeña parte del cromosoma 5, que luego se identificó como el sitio del gen supresor tumoral llamado *APC*. Una persona que hereda una deleción en *APC* está en una posición similar respecto de quienes heredan una deleción *RB*: si hay una mutación en el segundo alelo del gen en una célula determinada se pierde el valor protector de la función del gen. La pérdida del segundo alelo de *APC* hace que la célula pierda el control de crecimiento y prolifere hasta formar un pólipo, en lugar de diferenciarse en células epiteliales normales de la pared intestinal. Se presupone que la conversión de las células en pólipos con un estado más maligno, caracterizado por la capacidad para producir metástasis e invadir otros tejidos, se obtiene por la acumulación de mutaciones adicionales, incluidas las de *TP53*. Los genes *APC* mutados no sólo se hallan en las formas hereditarias del cáncer de colon, sino también hasta en

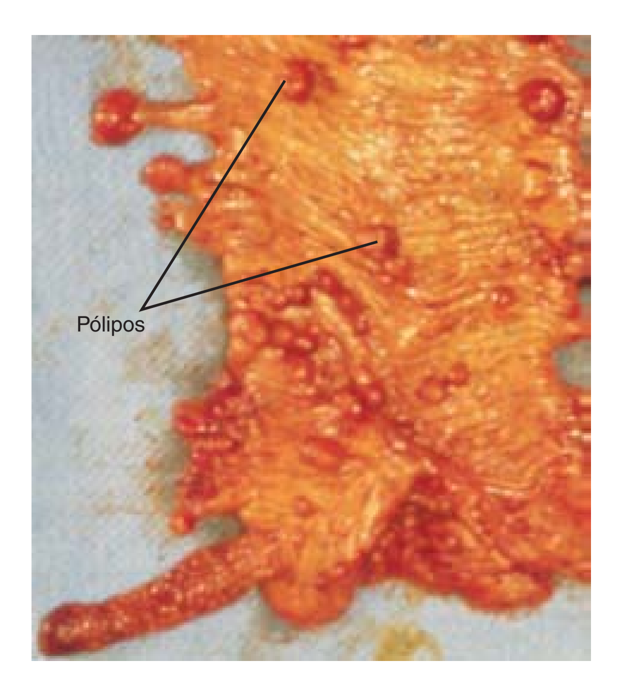


FIGURA 16-18 **Pólipos premalignos en el epitelio de un colon humano.** Fotografía de una porción de colon extirpado de un sujeto con síndrome de Gardner que muestra el patrón de formación de pólipos. Se encontraron patrones similares en el colon de personas con el trastorno hereditario de poliposis adenomatosa familiar del colon. (Cortesía de Randall W. Burt.)

80% de los tumores colónicos esporádicos, lo que sugiere que el gen tiene un papel principal en el desarrollo de esta enfermedad (fig. 16-8). La proteína codificada por el gen *APC* se une con varias proteínas distintas y su mecanismo de acción es complejo. En su papel mejor estudiado, APC limita el crecimiento celular mediante la interferencia con la transcripción de genes (p. ej., *MYC*) que estimulan la proliferación celular. También es posible que APC participe en la unión de microtúbulos con los cinetocoros de los cromosomas mitóticos. La pérdida de la función de APC podría dirigir de manera directa a la separación anormal de los cromosomas y la aneuploidía (pág. 592). En fechas recientes se detectó la presencia de DNA de *APC* mutado en la sangre de personas con cáncer colónico en fase temprana, lo cual plantea la posibilidad de una prueba diagnóstica para el trastorno.

Se estima que el cáncer mamario afecta a casi una de cada ocho de las mujeres que viven en Estados Unidos, Canadá y Europa. De estos casos, 5 a 10% se debe a la herencia de un gen que predispone al individuo al desarrollo de la enfermedad. Después de un esfuerzo intensivo de varios laboratorios, se identificaron dos genes llamados *BRCA1* y *BRCA2* a mediados del decenio de 1990 como los causantes de la mayoría de los casos hereditarios de cáncer mamario. Las mutaciones en *BRCA* también predisponen a la mujer al desarrollo de cáncer ovárico, el cual tiene un índice de mortalidad muy alto.

Las proteínas BRCA1 y BRCA2 han sido el centro de un gran esfuerzo de investigación, pero sus funciones exactas aún se desconocen. En la página 577 se señaló que las células poseen puntos de revisión que detienen el avance del ciclo celular después del daño al DNA. Las proteínas BRCA forman parte de un gran complejo proteico que responde al daño en el DNA y activa su reparación. Las células con proteínas BRCA mutantes contienen DNA no reparado junto con otras anomalías, como una cantidad excesiva de centrosomas, que pueden ocasionar una separación anormal de los cromosomas (véase fig. 14-17*c*). En las células con un gen *TP53* funcional, la falla de la reparación del daño del DNA conduce a la activación de p53, la cual detiene el avance de la célula por el ciclo celular o la conduce hacia la apoptosis, como se ilustra en la figura 16-19. A diferencia de la mayoría de los genes supresores tumorales, ninguno de los genes *BRCA* presenta mutaciones en las formas esporádicas de cáncer. Todavía no se descubre la razón que explique esta diferencia.

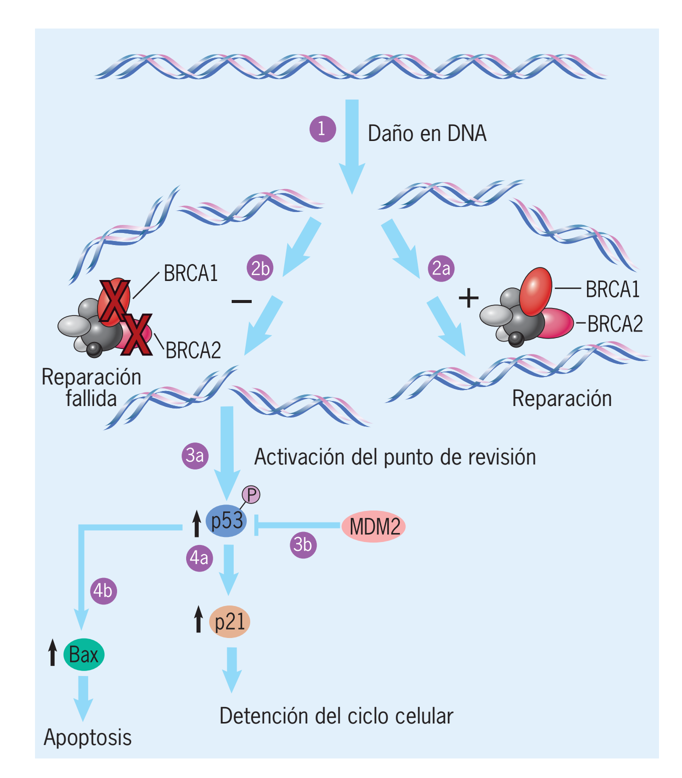


FIGURA 16-19 El daño en el DNA inicia la actividad de varias proteínas codificadas por genes supresores tumorales y protooncogenes. En esta figura se advierte que el daño del DNA causa roturas de la cadena doble del DNA (paso 1) que se reparan por un complejo multiproteico que incluye BRCA1 y BRCA2 (paso 2a). Las mutaciones en los genes que codifican estas proteínas pueden bloquear el proceso de reparación (paso 2b). Si no se repara el daño en el DNA, se activa un punto de revisión que conduce al incremento del nivel de actividad de p53 (paso 3a). La proteína p53 normal se inhibe por la interacción con la proteína MDM2 (paso 3b). El p53 es un factor de transcripción que activa la expresión de: (*a*) el gen *p21* (paso 4a), cuyo producto (p21) detiene el ciclo celular, o (*b*) el gen *BAX* (paso 4b), cuyo producto (Bax) conduce a la apoptosis. (Reimpresa con autorización de J. Brugarolas y T. Jacks. Nature Med 3:721, 1997; copyright 1997, Macmillan Magazines Ltd.)

En este capítulo ya se mencionó que la apoptosis es uno de los principales mecanismos del cuerpo para deshacerse de células tumorales potenciales. El mecanismo de la apoptosis se explicó en el capítulo previo, al igual que las vías que promueven la supervivencia en lugar de la destrucción celular. La vía de supervivencia celular mejor estudiada incluye la activación de una cinasa llamada PKB por acción del PIP_3 de fosfoinosítido. A su vez, el PIP_3 se forma por la actividad catalítica de la cinasa de lípido PI3K (véase fig. 15-23). La activación de PI3K/PKB conlleva una mayor probabilidad de que la célula sobreviva a un estímulo que en condiciones normales causaría su destrucción. Que una célula sobreviva o muera después de un fenómeno particular depende mucho del equilibrio entre las señales que fomentan y las que impiden la apoptosis. Las mutaciones que afectan este equilibrio, como las que contribuyen a la expresión excesiva de PKB, pueden romper el equilibrio en favor de la supervivencia celular, lo cual suministra a una célula cancerosa potencial una tremenda ventaja. Otra proteína que puede alterar el equilibrio entre la vida y la muerte de una célula es la fosfatasa de lípidos, PTEN, la cual retira el grupo fosfato de la posición 3 de PIP_3 y convierte a la molécula en $PI(4,5)P_2$, que no puede activar a PKB. Las células en las que se activan ambas copias del gen *PTEN* tienden a tener un nivel demasiado alto de PIP_3, lo cual da origen a una población de moléculas PKB con actividad excesiva. Al igual que otros genes supresores tumorales listados en el cuadro 16-1, las mutaciones en *PTEN* causan una rara enfermedad hereditaria caracterizada por un mayor riesgo de cáncer y estas mutaciones también se encuentran en diversos tipos de cáncer esporádicos. La mutación no es el único mecanismo por el cual pueden desactivarse los genes supresores tumorales. Los genes *PTEN* pierden a menudo su función como resultado de mecanismos epigenéticos, como la metilación del DNA, que impide la transcripción del gen (pág. 529). Cuando se introduce un gen *PTEN* normal en las células

Cuadro 16-2 Protooncogenes y tumores humanos: algunas referencias consistentes

Protooncogén	Neoplasia(s)	Lesión
ABL	Leucemia mielógena crónica	Translocación
BCL-2	Linfoma de células B	Translocación
CYCD1	Carcinoma mamario	Translocación
CDK4	Sarcomas	Amplificación
ERBB	Carcinoma de células escamosas; astrocitoma	Amplificación
NEU/HER2	Adenocarcinoma de mama, ovario y estómago	Amplificación
GIP	Carcinoma de ovario y glándula suprarrenal	Mutaciones puntuales
GSP	Adenoma de glándula hipófisis; carcinoma de tiroides	Mutaciones puntuales
MYC	Linfoma de Burkitt	Translocación
	Carcinoma de pulmón, mama y cuello uterino	Amplificación
L-MYC	Carcinoma de pulmón	Amplificación
N-MYC	Neuroblastoma, carcinoma pulmonar de células pequeñas	Amplificación
H-RAS	Carcinoma del colon, pulmón y páncreas; melanoma	Mutaciones puntuales
K-RAS	Leucemia mieloide aguda y linfoblástica; carcinoma tiroideo; melanoma	Mutaciones puntuales
N-RAS	Carcinoma de vías genitourinarias y tiroides; melanoma	Mutaciones puntuales
RET	Carcinoma de tiroides	Reordenamiento
TRK	Carcinoma de tiroides	Reordenamiento

Fuente: Tomado de J. M. Bishop, *Cell* 64:236, 1991, con autorización de Cell Press.

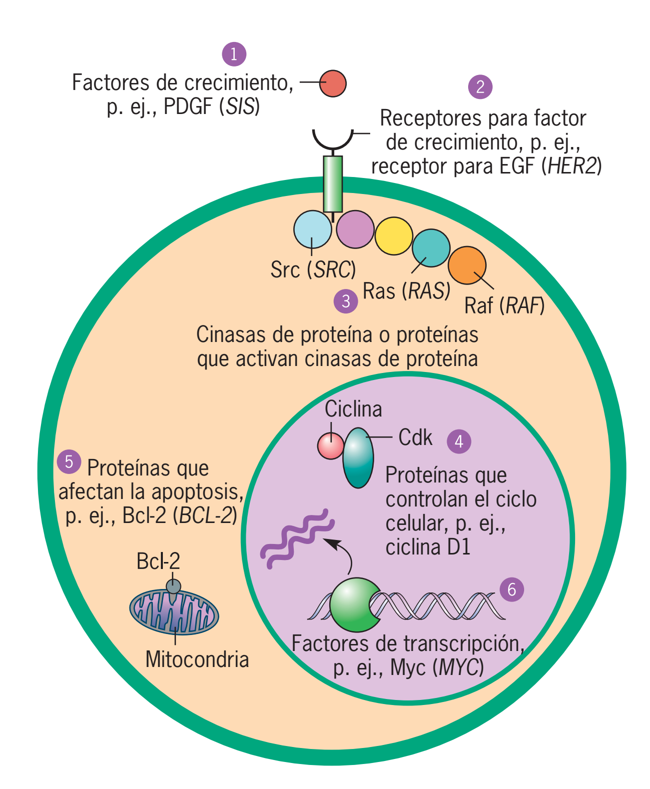


FIGURA 16-20 Esquema que resume los tipos de proteínas codificadas por los protooncogenes. Éstas incluyen factores de crecimiento (1), receptores para factores de crecimiento (2), cinasa de proteínas y las proteínas que las activan (3), proteínas que regulan el ciclo celular (4), proteínas que inhiben la apoptosis (5) y proteínas de unión con DNA (6). No se incluyen las proteínas que participan en mitosis, invasión hística y metástasis.

tumorales que carecen de una copia funcional del gen, las células casi siempre sufren apoptosis, como sería de esperar.

Oncogenes Como ya se describió, los oncogenes codifican proteínas que promueven la pérdida del control de crecimiento y la conversión de una célula a un estado maligno. Los oncogenes provienen de protooncogenes (pág. 670), que son genes que codifican proteínas con una función en la célula normal. La mayoría de los protooncogenes conocidos tiene un papel en el control del crecimiento y la división celulares. Numerosos oncogenes se identificaron inicialmente como parte de los genomas de virus tumorales de RNA, pero muchos más se han identificado debido a su importancia en la tumorigénesis en animales de laboratorio o muestras de tumores humanos. En el cuadro 16-2 se presentan algunos de los genes mejor estudiados. Diferentes oncogenes se activan en distintos tipos de tumores, lo cual refleja variaciones en las vías de señalización que operan en diversos tipos celulares. El oncogén que muta con mayor frecuencia en los tumores humanos es *RAS*, el cual codifica una proteína de unión con GTP (Ras), que funciona como un interruptor de apagado para una vía de señalización clave en el control de la proliferación celular (pág. 639).[4] Los mutantes oncogénicos de *RAS* casi siempre codifican una proteína en la que no puede estimularse la actividad de GTPasa y esto deja a la molécula en su forma activa unida con GTP que emite señales de proliferación continuas por la vía. La figura 16-20 resume las funciones de varios oncogenes y se explican a continuación.[5]

Oncogenes que codifican factores de crecimiento o sus receptores La primera conexión entre los oncogenes y los factores de crecimiento se estableció en 1983, cuando se descubrió que el virus de los simios causante de sarcoma contenía un oncogén (*sis*) derivado del gen celular para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), una proteína presente en la sangre humana. Las células cultivadas transformadas por este virus secretan grandes cantidades de PDGF al medio, lo cual induce la proliferación descontrolada de las células. La expresión excesiva de PDGF se ha referido en el desarrollo de tumores cerebrales (gliomas).

[4] En realidad, el genoma humano contiene tres genes *RAS* y tres genes *RAF* distintos que se activan en diferentes tejidos. De éstos, *KRAS* y *BRAF* son los que se vinculan más a menudo con la formación de tumores.

[5] Se remite al lector a la sección Perspectiva humana del capítulo 7 (pág. 260), en la que se encuentra una discusión sobre los genes que codifican las moléculas de la superficie celular y las proteasas extracelulares que tienen un papel importante en la invasión hística y la metástasis.

Se descubrió que otro virus oncogénico, el virus de la eritroblastosis aviar, porta un oncogén (*erbB*) que codifica un receptor para EGF que carece de parte del dominio extracelular de la proteína que se une con el factor de crecimiento. Se esperaría que el receptor alterado fuera incapaz de emitir señales a la célula para dividirse, pero sucede justo lo contrario. Esta versión anormal del receptor estimula a la célula en forma constitutiva, esto es, que la estimulación es independiente de la presencia o ausencia del factor de crecimiento en el medio. Esta es la razón por la que las células cultivadas que tienen el gen alterado proliferan en forma descontrolada. Se descubrió que varios tipos espontáneos de cáncer en humanos contienen células con alteraciones genéticas que afectan a los receptores para factores de crecimiento, incluido el EGFR. Lo más frecuente es que las células malignas contengan una cantidad mucho mayor de receptores en la membrana plasmática que las células normales. El exceso de receptores torna a las células sensibles a concentraciones mucho menores del factor de crecimiento, por lo que se estimulan para dividirse en condiciones que no afectarían a las células normales. Varios estudios sugieren que las mutaciones en *EGFR* ocurren comúnmente en cáncer pulmonar de pacientes que nunca han fumado, pero no en los de fumadores. Las mutaciones en el gen *KRAS* presentan la distribución opuesta. Esta observación sugiere que los tipos de cáncer pulmonar en los dos grupos de pacientes tienen distinta progresión genética, aunque está alterada la misma vía de señalización (EGFR-Ras). Como se expone más adelante, los receptores de factores de crecimiento se han convertido en un blanco favorito para anticuerpos terapéuticos, que se unen al dominio extracelular del receptor, y para inhibidores moleculares pequeños, que se unen al dominio de tirosincinasa intracelular del receptor.

Oncogenes que codifican cinasas de proteína citoplásmicas Las cinasas de proteína sobreactivas funcionan como oncogenes al generar señales que causan proliferación o supervivencia celulares inapropiadas. Por ejemplo, Raf es una cinasa de proteína de serina-treonina que encabeza la cascada de la cinasa de MAP, la principal vía de señalización para controlar el crecimiento celular (pág. 640). Es evidente que Raf está en una posición adecuada para causar devastación en una célula y su actividad enzimática se altera como resultado de una mutación. Como sucede con los receptores para factores de crecimiento y Ras, las mutaciones que convierten a Raf en una enzima que se mantiene siempre en la posición de "encendido" tienen mayor probabilidad de convertir el protooncogén en un oncogén y contribuir a la pérdida del control del crecimiento celular.

El primer oncogén en descubrirse, *SRC*, también es una cinasa de proteína, pero ésta fosforila residuos de tirosina en sustratos proteicos en lugar de residuos de serina y treonina. La transformación de una célula por un virus tumoral que contenga *src* se acompaña de fosforilación de una gran variedad de proteínas. Entre los sustratos aparentes de Src figuran proteínas participantes en la transducción de la señal, el control del citoesqueleto y la adhesión celular. Por alguna razón desconocida, las mutaciones en *SRC* aparecen sólo rara vez en el repertorio de cambios genéticos de las células tumorales humanas.

Oncogenes que codifican factores de transcripción nuclear Varios oncogenes codifican proteínas que actúan como factores de transcripción. La progresión de las células por el ciclo celular requiere la activación (y represión) oportuna de una gran variedad de genes cuyos productos contribuyen de varias maneras al crecimiento y división celulares. Por lo tanto, no es sorprendente que las alteraciones en las proteínas que controlan la expresión de estos genes puedan trastornar en grado notorio los patrones normales de crecimiento celular. Es probable que el oncogén mejor estudiado cuyo producto actúa como factor de transcripción sea *MYC*.

En la página 572 se mencionó que las células que no se encuentran en una etapa de crecimiento y división activos tienden a retirarse del ciclo celular y entran a una etapa conocida como G_0, de la cual pueden recuperarse. En condiciones normales, la proteína Myc es una de las primeras en aparecer cuando una célula que se halla en la etapa latente se estimula por factores de crecimiento para reingresar al ciclo celular y dividirse. Myc regula la expresión de una enorme cantidad de proteínas implicadas en el crecimiento y la proliferación celulares. Cuando la expresión de *MYC* se bloquea de manera selectiva, se bloquea la progresión de la célula por G_1. El gen *MYC* es uno de los protooncogenes que se alteran en los diferentes tipos de cáncer en humanos y muchas veces se amplifica en el genoma o cambia su ordenamiento como efecto de alguna translocación cromosómica. Se cree que los cambios cromosómicos remueven al gen *MYC* de sus influencias reguladoras normales y aumentan su nivel de expresión en la célula, lo que produce un exceso de proteína Myc. Uno de los tipos más comunes de cáncer entre las poblaciones africanas, el linfoma de Burkitt, se debe a la translocación de un gen *MYC* a una posición adyacente a un gen de anticuerpo. La enfermedad se desarrolla sobre todo en personas que también se infectaron con el virus de Epstein-Barr. Por razones desconocidas, este mismo virus causa sólo infecciones menores (mononucleosis) en los sujetos que viven en países occidentales y no se vincula con el desarrollo de neoplasias.

Oncogenes codificantes de productos que afectan la apoptosis La apoptosis es uno de los mecanismos clave del cuerpo para deshacerse de células tumorales en etapa temprana de su progresión hacia la malignidad. Por consiguiente, es de esperar que cualquier alteración que atenúe la capacidad de una célula para destruirse a sí misma eleve la probabilidad de que esa célula dé origen a un tumor. Esto fue evidente en la exposición anterior del cometido de la vía PI3K/PKB en la supervivencia celular y la carcinogénesis (pág. 678). El oncogén con una relación más estrecha con la apoptosis es *BCL-2*, que codifica una proteína unida con la membrana que inhibe la apoptosis (pág. 655).

El papel de *BCL-2* en la apoptosis se revela con mayor claridad en los fenotipos de ratones en los que se eliminó el gen *Bcl-2*. Una vez formados, los tejidos linfoides de estos ratones presentan una regresión drástica como resultado de la apoptosis diseminada. Al igual que *MYC*, el producto del gen *BCL-2* se vuelve oncogénico cuando se expresa en niveles mayores de lo normal, como sucede cuando el gen se traslada a un sitio anormal del cromosoma. Ciertos tipos de cáncer linfoides de humanos (llamados linfomas foliculares de células B) se vinculan con la translocación del gen *BCL-2* a un gen que codifica la cadena pesada de moléculas de anticuerpos. Se ha sugerido que la expresión exagerada del gen *BCL-2* conduce a la supresión de la apoptosis en los tejidos linfoides, lo que permite que las células anormales proliferen para formar neoplasias linfoides. El gen *BCL-2* también puede participar en la reducción de la efec-

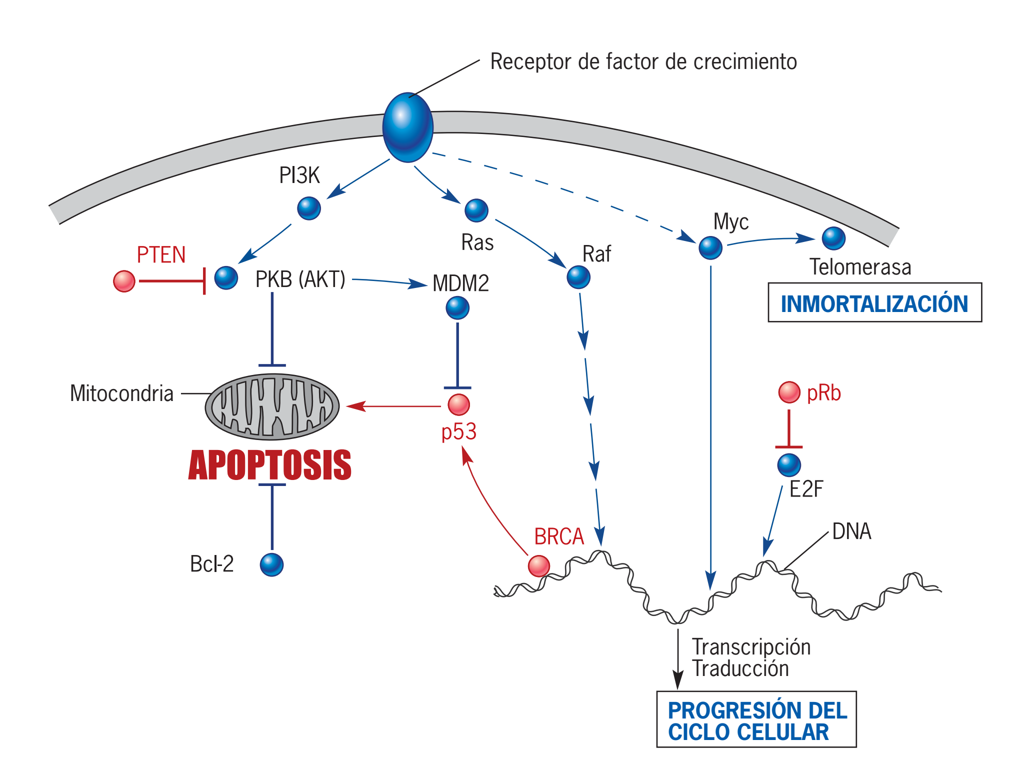


FIGURA 16-21 Resumen de varias de las vías de señalización implicadas en la carcinogénesis que se expusieron en esta sección. Supresores tumorales y supresión tumoral se muestran en rojo, mientras que oncogenes y estimulación tumoral se representan en azul. Las flechas indican activación, las líneas perpendiculares indican inhibición. La línea discontinua indica acción indirecta por activación de la expresión del gen *MYC*. La figura muestra sólo tres de los procesos que contribuyen a la carcinogénesis, a saber: apoptosis, progresión del ciclo celular e inmortalización.

tividad de la quimioterapia porque mantiene a las células vivas y en proliferación a pesar del daño por el tratamiento farmacológico. Para contrarrestar esta propiedad de las células cancerosas, varias compañías farmacéuticas están en proceso de desarrollo de compuestos que aumenten la probabilidad de las células cancerosas de dirigirse a la apoptosis.

En páginas anteriores se expusieron algunos de los más importantes supresores tumorales y oncogenes implicados en la tumorigénesis. La figura 16-21 constituye un resumen simplificado de algunas de estas proteínas y las vías de señalización en que operan. Supresores tumorales y vías supresoras tumorales se muestran en rojo, oncogenes y vías promotoras tumorales se muestran en azul.

El fenotipo mutador: genes mutantes participantes en la reparación del DNA Si se considera al cáncer como una enfermedad consecutiva a las alteraciones en el DNA de las células somáticas, se infiere que cualquier actividad que incremente la frecuencia de las mutaciones genéticas eleva la probabilidad del riesgo de desarrollar cáncer. Como se explica en el capítulo 13, los nucleótidos que presentan alteraciones químicas o los que se incorporan de manera incorrecta durante la replicación se eliminan en forma selectiva de la cadena de DNA mediante la reparación del DNA. Los procesos de reparación del DNA requieren los esfuerzos conjuntos de una cantidad considerable de proteínas, incluidas las que reconocen la lesión, las que retiran una porción de la cadena que contiene la lesión y las que sustituyen el segmento faltante con nucleótidos complementarios. Si cualesquiera de estas proteínas es defectuosa, puede esperarse que la célula afectada presente un índice demasiado alto de mutaciones que se describe como "fenotipo mutador". Es probable que las células con fenotipo mutador incurran en mutaciones, tanto en genes supresores tumorales como en oncogenes, lo cual incrementa en notable proporción su riesgo de volverse malignas.

En el capítulo 13 se explicó que los defectos en la reparación de la escisión nucleotídica (*nucleotide excision repair*, NER) conduce al desarrollo de un síndrome canceroso llamado xerodermia pigmentosa. En 1993 se obtuvo evidencia de que los defectos en un tipo diferente de reparación del DNA también podrían conducir al inicio de cáncer. En este caso, se realizaron estudios en células de pacientes con la forma hereditaria más frecuente de cáncer colónico, el cáncer hereditario de colon sin poliposis (HNPCC) para distinguirlo del tipo con formación de pólipos descrito antes. Cerca de 0.5% de la población es portadora de un gen defectuoso causante de HNPCC y representa alrededor de 3% de todos los casos de cáncer de colon. En la página 404 se mencionó que el genoma contiene grandes cantidades de secuencias de DNA repetitivas muy cortas llamadas microsatélites. El análisis del DNA de personas con HNPCC reveló que las secuencias de los microsatélites en las células tumorales tenían a menudo una longitud distinta a las secuencias correspondientes en el DNA de las células normales del mismo paciente. Se esperarían tales variaciones en el DNA de individuos diferentes, pero no en el DNA de diversas células de la misma persona.

El descubrimiento de la variación en la secuencia de los microsatélites en los cánceres hereditarios (y también en los tipos esporádicos de cáncer de colon) sugirió la probabilidad de que la causa fuera una deficiencia en el sistema de reparación de discrepancias (pág. 564). El respaldo de esta proposición se obtuvo de estudios en personas con HNPCC. En tanto que los extractos de células normales realizan la reparación de las discrepancias in vitro, los extractos de células tumorales de HNPCC presentan deficiencias para la reparación del DNA. El análisis del DNA de una gran cantidad de individuos con HNPCC reveló delecio-

nes o mutaciones debilitantes en cualquiera de varios genes que codifican proteínas que forman la vía de reparación de discrepancias del DNA. Las células con deficiencias en la reparación de discrepancias acumulan mutaciones secundarias en todo el genoma.

MicroRNA: nuevos participantes en la genética del cáncer Se recordará de la sección 11.5 que los microRNA son diminutos RNA reguladores que regulan negativamente la expresión de mRNA blancos. Dado que el cáncer ocurre como resultado de expresión génica anormal, no sería sorprendente descubrir que los miRNA participan de algún modo en la carcinogénesis. En 2002 se informó que los genes que codifican dos microRNA, miR-15a y miR-16, sufrían deleción o subexpresión en la mayoría de los casos de leucemia linfocítica crónica. Después se mostró que estos dos miRNA inhiben la expresión del mRNA que codifica la proteína antiapoptósica BCL-2, un conocido protooncogén (pág. 680). En ausencia de los miRNA, la proteína BCL-2 oncogénica se sobrexpresa, lo que promueve el desarrollo de leucemia. Debido a que inhiben la carcinogénesis, los genes que codifican estos dos miRNA pueden considerarse supresores tumorales. Cuando las células leucémicas que carecen de miR-15a y miR-16 se manipularon por ingeniería genética para reexpresar estos RNA, sufrieron apoptosis, como se esperaría si se restaurara una actividad supresora tumoral faltante. También se ha demostrado que la expresión de uno de los oncogenes humanos más importantes, *RAS*, es inhibida por un miRNA, a saber *let-7*, que fue el primer miRNA descubierto (pág. 462).

Algunos miRNA actúan más como oncogenes que como supresores tumorales. Por ejemplo, un grupo específico de genes miRNA se sobrexpresa durante la formación de determinados linfomas. La sobrexpresión de estos miRNA se debe a que el grupo génico que los codifica está presente en mayor número (está amplificado) en las células tumorales. Cuando se manipula genéticamente a ratones para que sobrexpresen estos miRNA específicos, los animales desarrollan linfomas como se predecíría si los genes que los codifican actuaran como oncogenes. Aún no es clara la importancia de los miRNA para la ocurrencia global de cáncer humano, pero varios estudios con micromatrices en que se analizan grandes cantidades de estos diminutos RNA reguladores sugieren que la mayoría de los cánceres del ser humano tienen un perfil de expresión de miRNA característico, del mismo modo en que tienen un perfil de expresión de mRNA característico. Estos estudios sugieren además que tanto miRNA como *let-7* podrían actuar en última instancia como otra arma en el arsenal de terapias anticancerosas.

Conclusiones sobre la genética del cáncer Ahora que se recuperaron algunos de los hallazgos recientes sobre las bases genéticas de la formación de tumores, se puede advertir por qué es probable que la guerra contra el cáncer requiera la alteración permanente de la composición genética de las células de un tumor. El hallazgo de que muchos tipos distintos de cáncer comparten los mismos defectos genéticos, como una alteración en *TP53*, *RB* o *RAS*, eleva la esperanza de que muchas neoplasias puedan tratarse con una medida común. Por ejemplo, si pudiera desarrollarse un fármaco que simulara los efectos de p53 o inhibiera a Ras, entonces podrían tratarse una gran variedad de tipos de cáncer con el mismo agente.

Antes de dejar el tema de la genética del cáncer hay que señalar que no todos comparten la visión presentada aquí, que el cáncer es una progresión gradual de múltiples pasos con mutaciones puntuales. Algunos investigadores argumentan que el índice de mutaciones en los seres humanos no es lo bastante alto para que las células acumulen las mutaciones necesarias para completar la transformación maligna durante la vida de un individuo. En lugar de ello, propusieron que la carcinogénesis se inicia por fenómenos catastróficos que conducen a la inestabilidad genética diseminada en una cantidad relativamente pequeña de divisiones celulares. Por ejemplo, las mutaciones en un gen participante en la replicación del DNA o la reparación del DNA, como ocurre en los casos de HNPCC, podrían engendrar células en poco tiempo que portaran grandes anormalidades genéticas. De acuerdo con otra proposición, las células que pasaron por una división celular anormal y tienen cantidades anormales de cromosomas son los iniciadores probables de neoplasias cancerosas. La mejor forma de decidir entre estas posibilidades es analizar el estado del genoma en las células en etapas muy tempranas del desarrollo de los tumores. Por desgracia, para el interés de los investigadores y los pacientes con cáncer, es imposible identificar los tumores cuando están compuestos por una pequeña cantidad de células. Para el momento en que se reconocen las anomalías, las células ya tienen un alto grado de alteraciones genéticas, lo que dificulta confirmar si estas anormalidades genéticas son la causa o un efecto del crecimiento tumoral.

REVISIÓN ?

1. Contraste un tumor benigno con uno maligno; los genes supresores tumorales con los oncogenes; las mutaciones con acción dominante y las que actúan en forma recesiva; los protooncogenes y los oncogenes.
2. ¿A qué se refiere la afirmación de que el cáncer es resultado de una progresión genética?
3. ¿Por qué el p53 se ha descrito como el "guardián del genoma"?
4. Mencione dos mecanismos mediante los cuales actúa p53 para prevenir que una célula se torne maligna.
5. ¿Cómo pueden usarse las microseries de DNA para identificar el tipo de cáncer que sufre un paciente?, ¿cómo podrían emplearse para optimizar el tratamiento del cáncer?
6. ¿Qué tipos de proteínas codifican los protooncogenes y de qué manera las mutaciones en cada tipo de protooncogén hacen que una célula se vuelva maligna?

16.4 NUEVAS MEDIDAS PARA COMBATIR EL CÁNCER

Resulta dolorosamente evidente que los métodos ordinarios para combatir el cáncer, es decir, resección, quimioterapia y radiación, no suelen curar al paciente del cáncer metastásico, esto es, el que se diseminó desde un tumor primario. Debido a que matan grandes cantidades de células normales junto con las

cancerosas, quimioterapia y radiación tienden a causar graves efectos secundarios, además de tener utilidad curativa limitada para los estados más avanzados de cáncer. Durante decenios se ha abrigado la esperanza de que estas estrategias de "fuerza bruta" sean sustituidas por *tratamientos dirigidos*, basados en nueva información sobre la base molecular del cáncer. Existen varias maneras en que un tratamiento puede considerarse "dirigido": puede estar dirigido para atacar sólo células cancerosas, dejando intactas las células normales; puede estar dirigido contra una proteína específica cuya desactivación deja las células cancerosas incapaces de dividirse o sobrevivir, o puede estar dirigido contra las células cancerosas de un paciente específico con base en su patrón único de mutaciones somáticas; también es posible alguna combinación de lo anterior. Aunque la tasa de curación para la mayoría de los tipos de cáncer no ha mejorado en grado significativo en los últimos 50 años, hay razones para creer que en el futuro previsible se dispondrá de tratamientos dirigidos eficaces para enfrentar muchos de los tipos comunes de cáncer. Este optimismo se basa en gran medida en el notable éxito logrado con una pequeña cantidad de tratamientos dirigidos, que se expondrán en las siguientes páginas. Aunque estos éxitos han estado dispersos entre una cantidad mucho mayor de tratamientos propuestos fallidos, demuestran que el concepto de tratamiento dirigido es sólido, lo que puede considerarse una "prueba de principios". Y lo que es igual de importante, dan a los investigadores y a las compañías biotecnológicas el incentivo para invertir tiempo y dinero en la continuación de la búsqueda de mejores tratamientos contra el cáncer.

Las terapias anticancerosas que se describen en las secciones siguientes pueden dividirse en tres grupos: 1) las que dependen de anticuerpos o células inmunitarias para atacar a las células tumorales; 2) las que inhiben la actividad de las proteínas promotoras del cáncer, y 3) las que previenen el crecimiento de vasos sanguíneos que nutren al tumor.

Inmunoterapia

Todo el mundo ha oído o leído acerca de personas con cáncer metastásico y pronóstico de unos meses de vida que siguieron vivas y libres de malignidad años más tarde. Los casos mejor estudiados de estas "remisiones espontáneas" provienen de registros de finales del siglo XIX realizados por un médico de Nueva York llamado William Coley. El interés de Coley en el tema comenzó en 1891 cuando se encontró con los expedientes hospitalarios de un paciente con un tumor inoperable en el cuello que experimentó la remisión después de contraer una infección estreptocócica debajo de la piel. Coley localizó al individuo y lo encontró sin rastro del cáncer que alguna vez amenazó su vida. Coley pasó el resto de su vida en el desarrollo de un extracto bacteriano que estimulara al sistema inmunitario de las personas para atacar y destruir las células malignas después de inyectarlo bajo la piel. El trabajo no careció de éxitos, sobre todo contra ciertos sarcomas poco frecuentes de tejido blando. Aunque el uso de la toxina de Coley, como se llamó más tarde, nunca tuvo una aceptación muy amplia, los resultados de este médico confirmaron las observaciones anecdóticas de que el cuerpo tiene la capacidad de destruir un tumor, incluso cuando ya está bien establecido. En fechas recientes se han intentado dos formas terapéuticas generales que incluyen al sistema inmunitario: la inmunoterapia pasiva y la inmunoterapia activa.

La *inmunoterapia pasiva* es una forma que intenta tratar a los sujetos con cáncer mediante la administración de anticuerpos como agentes terapéuticos. Estos anticuerpos reconocen y se unen con proteínas específicas que tienen un papel clave en las actividades del tumor contra el que se dirigen. Una vez unido, el anticuerpo orquesta un ataque contra la célula, el cual es ejecutado por otros elementos del sistema inmunitario. Como se explica en la sección 18.19, la producción de anticuerpos monoclonales capaces de unirse con antígenos blanco particulares empezó a desarrollarse a mediados del decenio de 1970. Durante los primeros 20 años, los intentos para usar estas proteínas como agentes terapéuticos fallaron por diversas razones. La más notoria de ellas es que los anticuerpos se producían en células de ratón y estaban codificadas por genes de ratón. Como resultado, los anticuerpos se reconocían como extraños y se eliminaban de la corriente sanguínea antes de tener oportunidad de actuar. En los esfuerzos ulteriores, los investigadores pudieron producir "anticuerpos humanizados", que son anticuerpos formados en su mayor parte por proteínas humanas, excepto por una parte relativamente pequeña que reconoce al antígeno, que aún conserva su naturaleza de ratón. En los últimos años, los investigadores produjeron anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos del todo humana. En una de las modalidades, los ratones se sometieron a ingeniería genética para que su sistema inmunitario liberara moléculas de anticuerpos humanos.

En la actualidad hay cerca de una docena de anticuerpos monoclonales aprobados para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades. En este momento se prueban otros 150 o más. La herceptina es un anticuerpo humanizado dirigido contra un receptor de la superficie celular (Her2) que se une con un factor de crecimiento que estimula la proliferación de las células de cáncer mamario. Se cree que la herceptina inhibe la activación del receptor mediante el factor de crecimiento y estimula la interiorización del receptor (pág. 314). Alrededor de 25% de las variantes de cáncer de mama se componen de células con expresión excesiva del gen *HER2*, lo cual hace que estas células sean muy sensibles a la estimulación por el factor de crecimiento. Las pruebas clínicas demostraron que la herceptina es eficaz, sea sola o combinada con quimioterapia, para atenuar el ritmo de crecimiento del cáncer mamario en un porcentaje significativo de estos pacientes. En un estudio realizado en 2005 entre 3 000 mujeres con cáncer mamario en etapa inicial se informó que la herceptina redujo la probabilidad de recurrencia de la enfermedad en alrededor de 50% en un periodo de cuatro años. Hasta ahora, el anticuerpo humanizado más efectivo es el Rituxan, que se aprobó en 1997 para el tratamiento del linfoma de células B no Hodgkin. El Rituxan se une con una proteína de la superficie celular (CD20) que se encuentra en las células B malignas en cerca de 95% de los casos con esta enfermedad. La unión del anticuerpo con la proteína CD20 inhibe el crecimiento celular e induce a las células para dirigirse a la apoptosis. La introducción de este anticuerpo revirtió por completo la perspectiva para las personas con este tipo particular de tumoración. La gente que alguna vez tuvo un pronóstico catastrófico ahora posee una probabilidad excelente de alcanzar la remisión completa de la enfermedad.

En los últimos años se han sometido a ensayos clínicos varios anticuerpos totalmente humanos contra diversos tipos de cáncer. Uno de ellos, llamado panitumumab, que está dirigido contra el receptor de EGF, ha resultado muy promisorio

para el tratamiento de cáncer de colon metastásico. Debido a que es una proteína humana, el panitumumab permanece en la circulación el tiempo suficiente para que pueda administrársele cada dos semanas. Además, actualmente se desarrolla una nueva generación de anticuerpos que contienen un átomo radiactivo o un compuesto tóxico conjugado con la molécula de anticuerpo. Según lo planeado, el anticuerpo dirige al complejo hacia la célula cancerosa y el átomo o compuesto acompañantes destruyen la célula blanco. En el momento en que esto se escribe, dos anticuerpos antiCD20 con marca radiactiva (ibritumomab tiuxetan y ^{131}I-tositumomab) han sido aprobados para el tratamiento del linfoma de células B no Hodgkin, y un anticuerpo unido a un fármaco tóxico (gemtuzumab ozogamicina) contra la leucemia mieloide aguda.

La *inmunoterapia activa* (o *adoptiva*) es una forma que intenta que el propio sistema inmunitario de la persona participe en la lucha contra las células malignas. El sistema inmunitario evolucionó para reconocer y destruir materiales extraños, pero los cánceres provienen de las propias células del individuo. Aunque muchas células tumorales tienen proteínas (p. ej., telomerasa) que no se expresan de manera normal en las células sanas, o proteínas mutadas (p. ej., Ras) que son distintas a las que se encuentran en las células normales, aún son proteínas del hospedador presentes en células del hospedador. Como resultado, el sistema inmunitario casi nunca reconoce a estas proteínas como "inapropiadas". Incluso si la persona tiene células inmunitarias (células T) que reconocen los antígenos relacionados con el tumor, las neoplasias desarrollan mecanismos que les permiten escapar a la destrucción inmunitaria. Se han formulado muchas medidas diferentes para vencer estos obstáculos y estimular al sistema inmunitario a fin de que establezca una respuesta vigorosa contra las células tumorales. En la mayoría de los estudios, las células inmunitarias se aíslan del paciente, se estimulan in vitro de una forma u otra, se permite que proliferen en cultivo y luego se introducen de nuevo en el individuo. En algunos estudios, las células inmunitarias aisladas se modifican genéticamente antes de la proliferación para elevar su potencial de ataque a los tumores. Por muchos años, los ensayos clínicos con estos métodos fueron desalentadores, pero artículos recientes dan pie a un optimismo cauteloso. En muchos de estos estudios, una minoría significativa de los pacientes ha tenido una reacción positiva al tratamiento, lo cual significa que cuando menos sus tumores se encogieron de tamaño o extensión, y la expectativa de supervivencia aumentó en grado significativo. Provenge, que ha sido promisorio en ensayos clínicos con pacientes que padecen de cáncer prostático avanzado, es el primero de estos tratamientos que al parecer será aprobado. Dicho fármaco está diseñado para montar una inmunorreacción contra células que contienen una enzima específica (fosfatasa ácida prostática), que es expresada por este cáncer. El objetivo final de los investigadores del cáncer es producir tratamientos inmunológicos preventivos en los que las personas se vacunen con antígenos que impidan de manera permanente el desarrollo de cáncer que ponga en peligro su vida.

Inhibición de la actividad de proteínas promotoras de cáncer

Las células cancerosas se comportan como lo hacen porque contienen proteínas que están presentes en concentración anormal o exhiben actividad anormal. Varias de estas proteínas se ilustran en la figura 16-20. En muchos casos, el crecimiento o la supervivencia (o ambos) de las células tumorales depende de la actividad continua de una o más de estas proteínas anormales. Esta dependencia se conoce como "adicción a oncogenes". Si puede bloquearse la actividad de estas proteínas en forma selectiva, debe ser posible detener el crecimiento descontrolado y las propiedades invasivas de las células malignas. Con este objetivo en mente, los investigadores sintetizaron un arsenal virtual de compuestos de bajo peso molecular que inhiben la actividad de las proteínas promotoras del cáncer. Algunos de estos fármacos están hechos a la medida para inhibir una proteína particular (pág. 73), mientras que otros se identificaron al azar en la detección de grandes cantidades de compuestos que sintetizaron las compañías farmacéuticas. Aunque varios de estos compuestos parecen promisorios para detener el crecimiento de varios tipos de tumores, un compuesto ha tenido un éxito sin paralelo en las pruebas clínicas en pacientes con leucemia mielógena crónica (CML).

Antes ya se mencionó que ciertos tipos de cáncer se deben a translocaciones cromosómicas específicas. La CML es consecuencia de una translocación que pone a un protooncogén (*ABL*) en contacto con otro gen (*BCR*) para formar un gen quimérico (*BCR-ABL*). Las células progenitoras sanguíneas que tienen esta translocación expresan un alto nivel de actividad de cinasa de tirosina Abl, la cual hace que las células proliferen en forma descontrolada e inicien la formación del tumor. Como se expone en la página 73, se ha identificado un compuesto llamado imatinib que inhibe en forma selectiva la cinasa Abl mediante la unión con la forma inactiva de la proteína e impide su fosforilación por otra cinasa, lo cual es preciso para la activación de Abl. Las pruebas clínicas iniciales con imatinib tuvieron gran éxito e indujeron la remisión de casi todos los sujetos con CML que recibieron dosis suficientes del fármaco. Estos estudios confirmaron la idea de que la eliminación de un solo producto oncogénico requerido podría detener el crecimiento de un cáncer humano. El fármaco fue aprobado pronto y se ha usado por varios años. Los pacientes deben seguir tomando el medicamento para mantenerse en remisión, y muchos de ellos, en especial los que inician el tratamiento en una etapa avanzada, con el tiempo desarrollan resistencia. La mayoría de los casos de resistencia se debe a mutaciones en la porción *ABL* del gen de fusión. Esto ha motivado el desarrollo de una segunda generación de inhibidores dirigidos que permanecen activos contra la mayoría de las formas mutadas de la cinasa de ABL. Al parecer estos fármacos son eficaces para tratar los casos de CML resistentes a imatinib, y hacen pensar que el régimen medicamentoso ideal podría consistir en una combinación de varios inhibidores distintos que se dirijan a diferentes partes de la misma proteína, lo cual aseguraría que no surgieran mutantes resistentes a fármacos.

Se esperaba que el imatinib fuera seguido con rapidez por muchos otros fármacos inhibidores de proteína altamente eficaces. Aunque algunos inhibidores de molécula pequeña dirigidos contra proteínas han tenido éxito modesto en ensayos clínicos y han sido aprobados por la FDA, y otros cientos se prueban actualmente en la clínica, ninguno de los estudiados a la fecha ha sido capaz de detener por completo el crecimiento de ninguno de los tipos comunes de cáncer sólido, como los de mama, pulmón, próstata o páncreas. No es del todo clara la causa

de la dificultad para tratar estos tumores. Una podría ser que estos tumores son genéticamente más complejos y las células no dependen tanto de un solo producto oncogénico y de una vía de señalización aberrante como los tipos de células sanguíneas. Otra razón podría ser que sólo una fracción de los pacientes con un tipo específico de tumor sea sensible a un medicamento dado. Esto fue sugerido por el caso del getinib, un inhibidor de la tirosincinasa del receptor de EGF (EGFR). El getinib se probó originalmente en pacientes con cáncer de pulmón porque se sabía que estos tumores exhiben altas concentraciones de EGFR. En los ensayos clínicos iniciales se observó que alrededor de 10% de los pacientes en Estados Unidos y 30% de los pacientes japoneses reaccionaron positivamente al fármaco, mientras que el resto de la población no presentaba cambios. Un análisis posterior reveló que quienes reaccionaban y quienes no lo hacían tenían mutaciones que afectaban distintas regiones de la proteína EGFR. Este descubrimiento corrobora la idea de que al final probablemente los tratamientos anticancerosos dirigidos tendrán que personalizarse para que se ajusten a las modificaciones genéticas específicas presentes en los tumores de pacientes individuales.

Otra razón podría ser que los inhibidores no se dirigen contra las células apropiadas dentro del tumor. Esta posibilidad requiere de una mayor explicación pero plantea una importante cuestión acerca de la biología básica del cáncer y su tratamiento. A lo largo de este capítulo se ha considerado que un tumor es una masa de células relativamente homogénea. Cuando se les ve de este modo, todas las células de un tumor son capaces de proliferar de manera ilimitada, y todas las células tienen la oportunidad de convertirse en un fenotipo más maligno como resultado de cambio genético sobre la marcha. En años recientes ha emergido un nuevo concepto, el cual sugiere que si bien la mayoría de las células de un tumor pueden estar dividiéndose con rapidez, tienen un potencial relativamente limitado a largo plazo para mantener el tumor primario o iniciar un nuevo tumor secundario. En cambio, una cantidad relativamente pequeña de células dispersas por el tumor son responsables de mantener éste y promover su diseminación. Estas células "especiales" se conocen como *células madre cancerosas*, y existe considerable apoyo experimental de su existencia en leucemias, tumores encefálicos, tumores mamarios y otros tipos de cáncer. Sigue siendo incierto el que las células madre cancerosas se deriven o no de células madre normales, pero independientemente de ello, se propone que ambos tipos de células madre comparten las propiedades únicas de a) autorrenovación, b) potencial ilimitado para la división celular, y c) capacidad de dar origen a todas las demás células del tejido normal o el tumor. El concepto de célula madre cancerosa se plantea en esta parte del capítulo porque tiene importantes consecuencias para la terapia del cáncer. Si es cierto que sólo una pequeña subpoblación de células de un tumor tienen la capacidad de continuar la vida de éste, entonces el desarrollo de fármacos que maten con rapidez el grueso de la masa tumoral pero respeten las células madre cancerosas finalmente estará condenado al fracaso. Si bien hay en marcha esfuerzos para identificar células madre cancerosas en diversos tipos de tumores y aprender más acerca de sus propiedades, estas nuevas ideas no han tenido un impacto apreciable en el desarrollo de fármacos. Queda por ver si esto cambiará o no en el futuro.

Inhibición de la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis)

Mientras un tumor aumenta de tamaño, estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos, un proceso llamado *angiogénesis* (fig. 16-22). Los vasos sanguíneos son necesarios para llevar nutrimentos y oxígeno a las células tumorales de crecimiento rápido y para eliminar los productos de desecho. Los vasos sanguíneos también proporcionan conductos para que las células malignas se diseminen a otros sitios del cuerpo. En 1971, Judah Folkman de la *Harvard University* sugirió que los tumores sólidos podían destruirse si se inhibía su capacidad para formar nuevos vasos sanguíneos. Después de un cuarto de siglo de relativa oscuridad, esta idea floreció en una terapia anticancerosa prometedora.

Las células cancerosas promueven la angiogénesis mediante la secreción de factores de crecimiento, como VEGF, que

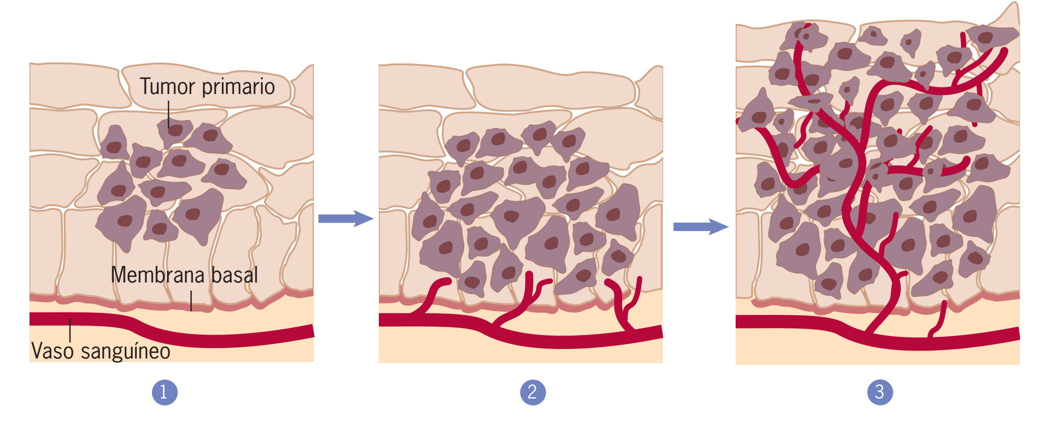


FIGURA 16-22 Angiogénesis y crecimiento tumoral. Pasos en la vascularización de un tumor primario. En el paso 1, el tumor prolifera para formar una pequeña masa de células. Siempre que se mantenga avascular (sin vasos sanguíneos), el tumor permanece muy pequeño (1 a 2 mm). En el paso 2, la masa tumoral produjo factores angiógenos que estimulan a las células endoteliales de los vasos cercanos para crecer hacia las células tumorales. En el paso 3, el tumor se vascularizó y ahora es capaz de un crecimiento ilimitado. (TOMADA DE B. R. ZETTER, CON AUTORIZACIÓN DE ANN REV MED, VOL 49. © 1998 ANNUAL REVIEWS WWW.ANNUALREVIEWS.ORG.)

actúan sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos circundantes y los estimulan para proliferar y desarrollar nuevos vasos. Del mismo modo que hay estimulantes de la angiogénesis, también hay inhibidores. Ya se identificaron varios de los inhibidores naturales, como la endostatina y la trombospondina, pero compañías de biotecnología han desarrollado casi todos los inhibidores angiógenos. En este grupo de sustancias se incluyen anticuerpos y compuestos sintéticos dirigidos contra integrinas, factores de crecimiento y receptores para factores de crecimiento. Los estudios preclínicos con ratones y ratas sugieren que los inhibidores angiógenos podrían ser efectivos para detener el crecimiento tumoral. Lo más importante: los tumores tratados con estos inhibidores no se volvieron resistentes a la aplicación repetida del fármaco. Las células tumorales se tornan resistentes a los agentes quimioterápicos usuales por la inestabilidad genética de las células, las cuales pueden evolucionar a formas resistentes. Sin embargo, los inhibidores de la angiogénesis se dirigen a células endoteliales normales, con características genéticas estables, que conservan su respuesta a la presencia de estos agentes. Existen otras razones que hacen de los inhibidores de la angiogénesis un tratamiento promisorio: no interferirán en las actividades fisiológicas normales, porque la angiogénesis no es una actividad necesaria en un adulto maduro; actúan en células que revisten los vasos sanguíneos, directamente accesibles a los fármacos llevados por el torrente sanguíneo, y deben ser ampliamente eficaces contra muchos tipos distintos de tumores, que se supone emplean los mismos mecanismos de angiogénesis.

La inhibición de la angiogénesis en los tumores humanos no es una tarea fácil como podría esperarse con base en los estudios con ratones. Hasta ahora, los resultados más prometedores se han obtenido con un anticuerpo humanizado (llamado bevacizumab) que se dirige contra el VEGF, el factor de crecimiento de células endoteliales que se sobrexpresa en la mayoría de los tumores sólidos. En el momento en que esto se escribe, bevacizumab es el único fármaco aprobado por la FDA cuya acción se basa solamente en su supuesta actividad antiangiogénica. La aprobación de la FDA se basó en ensayos clínicos que demostraron que bevacizumab, combinado con quimioterapia estándar, podría prolongar en algunos meses la vida de los pacientes con cáncer de colon metastásico. Aunque esto dista de constituir una curación, es un logro significativo en pacientes con cáncer de colon avanzado y ha proporcionado una base para la posterior exploración de este tipo de tratamiento. La terapia con bevacizumab de otros tipos de cáncer en general ha sido menos exitosa, y varios pacientes han experimentado efectos secundarios graves.

En la actualidad, la mejor terapéutica contra el cáncer es la detección temprana. Existen varios procedimientos de detección en uso, incluida la mamografía para identificar el cáncer mamario, la prueba de Papanicolaou para el cáncer cervical, las cuantificaciones de antígeno prostático específico para detectar el cáncer de próstata y la colonoscopia para reconocer el cáncer colorrectal. Se espera que en los próximos años los avances de la proteómica conduzcan al desarrollo de nuevas pruebas de detección basadas en los niveles relativos de varias proteínas presentes en la sangre. Esta terapia se explicó en la página 71. Es probable que los avances de la genómica contribuyan al proceso de detección al informar a cada persona los tipos de cáncer para los que tiene mayor probabilidad. Las pruebas de detección genómica ya están disponibles para los sujetos con antecedentes familiares sugestivos de mutaciones en el gen *BRCA1* y que, por consiguiente, podrían tener riesgo de desarrollar cáncer mamario. Cuanto más pronto se descubra el cáncer es mayor la probabilidad de supervivencia. En consecuencia, estos procedimientos de detección podrían tener un efecto notorio para disminuir los índices de mortalidad por cáncer.

VÍAS EXPERIMENTALES

El descubrimiento de los oncogenes

En 1911, Peyton Rous del *Rockefeller Institute for Medical Research* publicó un documento menor de una página de extensión (compartía la página con una nota sobre el tratamiento de la sífilis) y no tuvo repercusión alguna en la comunidad científica. Sin embargo, este documento notificaba una de las observaciones más previsoras en el campo de la biología celular y molecular.[1] Rous trabajaba con un sarcoma de pollo que podía propagarse de una gallina a otra mediante la inoculación al hospedador de la misma cepa con fragmentos del tejido tumoral. En este documento, Rous describió una serie de experimentos muy sugestivos de que el tumor podía transmitirse de un animal a otro mediante un "virus filtrable", que es un término que se había acuñado 10 años antes para describir a los agentes patógenos que eran lo bastante pequeños para pasar por filtros impermeables a las bacterias.

En sus experimentos, Rous retiró los tumores del pecho de las gallinas, molió las células en un mortero con arena estéril, centrifugó las partículas hasta formar una pelotilla, retiró el sobrenadante e impulsó el líquido sobrenadante por filtros de varias porosidades, incluido uno lo bastante pequeño para impedir el paso de bacterias. Luego, inyectó el filtrado en el músculo pectoral de una gallina receptora y encontró que un porcentaje significativo de los animales inyectados desarrollaba el tumor.

El virus descubierto por Rous en 1911 fue un virus con RNA. Para finales del decenio de 1960 se descubrió que virus similares se relacionaban con tumores mamarios y leucemias en roedores y gatos. Se habían criado ciertas cepas de ratones que desarrollaban tumores específicos con una frecuencia muy elevada. Las partículas víricas con RNA pudieron verse dentro de las células tumorales y también en gemación de la superficie celular, como se muestra en la micrografía de la figura 1. Resultó evidente que el (los) gen(es) causante(s) de los tumores en estas cepas endogámicas se transmitía(n) por vía vertical, es decir, a través del huevo fecundado de la madre a los hijos, de manera que los adultos de cada generación siempre desarrollan el tumor. Estos estudios proporcionaron evidencia de que el genoma vírico puede heredarse a través de los gametos y transmitirse luego de una célula a otra mediante la mitosis sin que se observe un efecto obvio en el comportamiento de las células. La presencia de genomas víricos heredados no es una peculiaridad de las cepas endogámicas de laboratorio porque se demostró que ratones silvestres (salvajes) tratados con carcinóge-

nos químicos desarrollan tumores que a menudo contienen los mismos antígenos característicos de los virus tumorales de RNA y que muestran partículas víricas bajo el microscopio electrónico.

Una de las principales preguntas acerca de la transmisión vertical de los virus tumorales de RNA era si el genoma viral pasa de los padres a hijos como moléculas libres de RNA o se integra de alguna forma al DNA de la célula hospedadora. La evidencia indicó que la infección y la transformación por estos virus requerían la síntesis de DNA. Howard Temin de la *Wisconsin University* sugirió que la replicación de los virus tumorales de RNA ocurre mediante un intermediario de DNA, un provirus, que sirve como molde para la síntesis de RNA vírico. Sin embargo, este molde necesita una enzima única, una polimerasa de DNA dependiente de RNA que nunca se había encontrado en ningún tipo de célula. Más adelante, en 1970, David Baltimore del *Massachusetts Institute of Technology* y Temin y Satoshi Mizutani descubrieron de manera independiente una enzima con esta actividad.[2,3]

Baltimore examinó los viriones (las partículas víricas maduras) de dos virus tumorales de RNA, el virus de la leucemia de ratón de Rauscher (R-MLV) y el virus del sarcoma de Rous (RSV). Se incubó una preparación del virus purificado en condiciones que promoverían la actividad de una polimerasa de DNA, e incluía magnesio (o manganeso), cloruro de sodio, ditiotreitol (que previene que los grupos —SH de la enzima se oxiden) y los cuatro trifosfatos de desoxirribonucleósidos, uno de los cuales (TTP) se marcó con radiactividad. En estas condiciones, la preparación incorporó el precursor marcado de DNA en un producto insoluble en ácido que mostraba las propiedades del DNA (cuadro 1). Como es característico del DNA, el producto de la reacción se volvió soluble en ácido (indicativo de que se había convertido en productos de bajo peso molecular) mediante el tratamiento con desoxirribonucleasa pancreática o nucleasa de micrococos, pero no se afectó por la ribonucleasa pancreática ni por la hidrólisis alcalina (a la cual es sensible el RNA; cuadro 1). Se encontró que la enzima polimerizadora de DNA se sedimenta junto con las partículas víricas maduras, lo que sugiere que era parte del virión mismo y no una enzima donada por la célula hospedadora. Aunque el producto era insensible al tratamiento con ribonucleasa pancreática, el molde era muy sensible a esta enzima (fig. 2), sobre todo si los viriones se trataban antes con la ribonucleasa para luego agregar los otros componentes de la mezcla de reacción (fig.

Cuadro 1 Caracterización del producto de la polimerasa

Experimento	Tratamiento	Radiactividad insoluble en ácido	Porcentaje de producto no digerido
1	No tratado	1 425	(100)
	20 μg de desoxirribonucleasa	125	9
	20 μg de nucleasa de micrococo	69	5
	20 μg de ribonucleasa	1 361	96
2	No tratado	1 644	(100)
	Hidrolizado con NaOH	1 684	100

Fuente: D. Baltimore, reimpreso con autorización de *Nature* 226:1210, 1970. © 1970, Macmillan Magazines, Ltd.

FIGURA 1 Micrografía electrónica de un virus de la leucemia del ratón Friend que se desprende por gemación de la superficie de una célula leucémica cultivada. (Por cortesía de E. de Harven.)

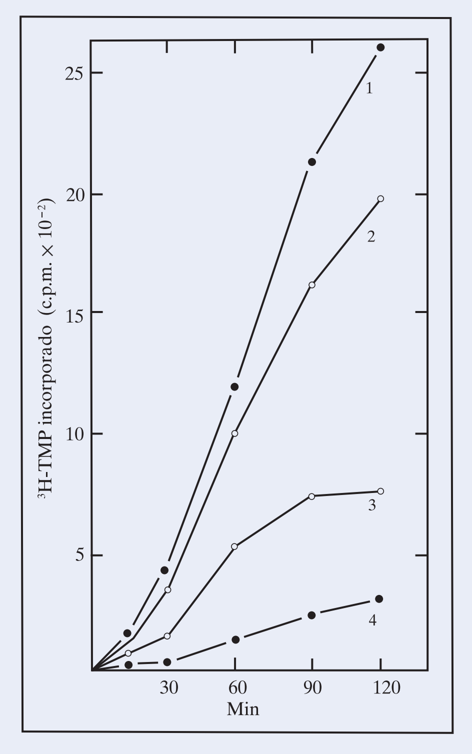


FIGURA 2 Incorporación de radiactividad de [^{3}H]TTP en un precipitado insoluble en ácido por la polimerasa de DNA del virus de la leucemia murina de Rauscher tanto en presencia como en ausencia de ribonucleasa. (Nota: el precursor TTP marcado se convierte en TMP cuando se incorpora en el DNA.) Curva 1, sin ribonucleasa agregada; curva 2, preincubada sin ribonucleasa agregada durante 20 min antes de añadir [^{3}H]TTP; curva 3, ribonucleasa adicionada a la mezcla de reacción; curva 4, preincubada con ribonucleasa antes de añadir [^{3}H]TTP. (Reimpresa con autorización de D. Baltimore, Nature 226:1210, 1970. © 1970, Macmillan Magazines Ltd.)

2, curva 4). Los resultados reforzaron la idea de que el RNA vírico provenía del molde para la síntesis de una copia de DNA, la cual tal vez servía como molde para la síntesis de mRNA vírico necesario para la infección y transformación. Estos experimentos no sólo sugieren que la transformación celular por los virus tumorales de RNA ocurre por un intermediario de DNA, sino que también contradijeron el concepto antiguo propuesto al principio por Francis Crick y conocido como el dogma central, que aseveraba que la información de una célula siempre fluía del DNA al RNA y a la proteína. La polimerasa de DNA dependiente de RNA recibió el nombre de transcriptasa inversa.

Durante el decenio de 1970, la atención se fijó en la identificación de los genes portados por los virus tumorales que producían la transformación y el mecanismo de acción de los productos génicos. La evidencia de los análisis genéticos indicó que podían aislarse cepas mutantes de virus que conservaban la capacidad para crecer en células hospedadoras, pero no podían transformar a la célula para que mostrara propiedades malignas.[4] Por lo tanto, la capacidad para transformar a la célula residía en una porción limitada del genoma vírico.

Estos hallazgos establecieron la base para una serie de documentos publicados por Harold Varmus, J. Michael Bishop, Dominique Stehelin y sus colaboradores de la *California University*, en San Francisco. Estos investigadores comenzaron con el aislamiento de cepas mutantes del virus del sarcoma aviar (ASV) que tenían deleciones de 10 a 20% del genoma, lo que tornaba al virus incapaz de inducir sarcomas en pollos o transformar fibroblastos en cultivos. El gen causante de la transformación, que no existe en estos mutantes, se denominó *src* (de sarcoma). Para aislar el DNA correspondiente a las regiones eliminadas de estos mutantes, que se supone portan los genes necesarios para la transformación, se adoptó la siguiente conducta experimental.[5] Se utilizó el RNA de los genomas de viriones completos (oncógenos) como molde para la formación de un DNA complementario (cDNA) de una sola cadena y con marca radiactiva, para lo cual se usó transcriptasa inversa. Luego, el cDNA marcado (que se encuentra como fragmentos) se unió (en un híbrido) con el RNA obtenido de uno de los mutantes con la deleción. Los fragmentos de DNA que no formaron híbridos con el RNA representan las porciones del genoma que se habían eliminado del mutante incapaz de inducir transformación y, en consecuencia, se presupuso que contenían el gen necesario para que el virus causara la transformación. Los fragmentos de DNA que no formaron híbridos con el RNA se separaron de los que formaban parte de los híbridos DNA-RNA mediante cromatografía de columna. Con este procedimiento básico se aisló una secuencia de DNA conocida como $cDNA_{sarc}$, que correspondía a cerca de 16% del genoma viral (1 600 nucleótidos de una longitud genómica total de 10 000 nucleótidos).

Una vez aislado, el $cDNA_{sarc}$ resultó ser una sonda muy útil. Primero se demostró que este cDNA marcado forma híbridos con el DNA extraído de las células de diversas especies de aves (pollo, pavo, codorniz, pato y emú), lo que indica que los genomas celulares de estas aves contienen una secuencia de DNA muy relacionada con *src*.[6]

Estos hallazgos proporcionaron la primera evidencia sólida de que en realidad existe un gen portado por un virus tumoral que induce transformación celular en el DNA de las células normales (no infectadas) y, por lo tanto, se asume que es parte del genoma normal de las células. Estos resultados indicaron que los genes transformadores del genoma viral (los oncogenes) no son genes víricos reales, sino genes celulares que captaron los virus tumorales del RNA durante una infección previa. La posesión de este gen derivado de la célula parece dotar al virus del poder para transformar a las mismas células en las que este gen se encuentra en condiciones normales. El hecho de que la secuencia *src* se halle en todas las especies de aves evaluadas sugiere que la secuencia se ha conservado durante la evolución de las aves y, por consiguiente, se presupone que regula alguna actividad básica de las células normales. En un estudio posterior se encontró que el $cDNA_{sarc}$ se une con el DNA de todos los vertebrados, incluidos los mamíferos, pero no con el DNA de erizos marinos, moscas de la fruta o bacterias. Con base en estos resultados, se pudo concluir que el gen *src* no sólo se encuentra en el RNA del genoma del ASV y el genoma de las células de pollo a las que puede infectar, sino que también existe un gen homólogo en el DNA de los vertebrados con relaciones distantes, lo cual sugiere que tiene alguna función crucial en las células de todos los vertebrados.[7]

Estos hallazgos dieron origen a muchas preguntas; las principales fueron las siguientes: a) ¿cuál es la función del producto del gen *src*? y b) ¿de qué manera la presencia del gen vírico *src* (conocido como v-*src*) altera el comportamiento de una célula normal que ya tiene una copia del gen celular (conocido como c-*src*)?

Ray Erikson y sus colegas de la *Colorado University* fueron los primeros en identificar el producto del gen *src* mediante dos procedimientos independientes: a) precipitación de la proteína de extractos de células transformadas por anticuerpos preparados a partir de animales infectados con RSV y b) síntesis de la proteína con un sistema de síntesis proteica libre de células con el gen vírico como molde. Con estos procedimientos se descubrió que el producto del gen *src* es una proteína de 60 000 daltones a la que llamaron $pp60^{src}$.[8] Cuando se incubó $pp60^{src}$ con [^{32}P]ATP, los grupos fosfato radiactivos se transfirieron a las cadenas pesadas de las moléculas de anticuerpo (IgG) relacionadas que se emplearon en la precipitación inmunitaria. Este descubrimiento sugirió que el gen *src* codifica una enzima que tiene actividad de cinasa de proteína.[9] Cuando las células infectadas con ASV se fijaron, cortaron e incubaron con anticuerpos marcados con ferritina contra $pp60^{src}$, se encontró que los anticuerpos se localizaban en la superficie interna de la membrana plasmática, lo que sugiere una concentración del producto del gen *src* en esta parte de la célula (fig. 3).[10]

Estos fueron los primeros estudios en descubrir la función de un oncogén. Una cinasa de proteína es el tipo de producto génico del que pudiera esperarse que tuviera actividad transformadora potencial porque puede regular las actividades de muchas otras proteínas, cada una de las cuales podría tener una función crucial en una u otra actividad relacionada con el crecimiento celular. El análisis adicional del papel del producto del gen *src* condujo a un hallazgo inesperado. A diferencia de todas las otras cinasas de proteína cuya función se había estudiado, $pp60^{src}$ transfería grupos fosfato a residuos de tirosina en la proteína sustrato, y no a residuos de serina o treonina.[11] La existencia de residuos de tirosina fosforilados había escapado a la detección previa porque los residuos fosforilados de serina y treonina son unas 3 000 veces más abundantes en las células que la fosfotirosina, y porque los residuos de fosfotreonina y fosfotirosina son difíciles de separar uno del otro mediante procedimientos electroforéticos tradicionales. No sólo el producto del gen vírico *src* (v-*src*) codifica una proteintirosincinasa; lo mismo hace c-*src*, la versión celular del gen. Sin embargo, el número de residuos fosforilados de tirosina en las proteínas de las células transformadas por RSV era cerca de ocho veces mayor que en las células control. Este descubrimiento sugirió que la versión vírica del gen puede inducir la transformación porque tiene un nivel más alto de actividad que la versión celular.

Los resultados del estudio del RSV proporcionaron evidencia de que la mayor actividad del producto de un oncogén puede ser la clave para convertir a una célula normal en una maligna. Pronto hubo evidencia de que el fenotipo maligno también podía inducirse con un oncogén que contuviera una secuencia alterada de nucleótido. Robert Weinberg y sus colegas del *Massachusetts Institute of Technology* realizaron un estudio clave con la técnica de transfección de DNA.[12]

Weinberg comenzó los estudios mediante la obtención de 15 líneas celulares malignas distintas que derivaron de células de ratón tratadas con una sustancia carcinógena. Por lo tanto, estas células se habían tornado malignas sin exponerlas a los virus. Se extrajo el DNA de cada una de estas líneas celulares y se utilizó para transfectar un tipo de fibroblasto de ratón no maligno llamado NIH3T3. Las células NIH3T3 se seleccionaron para estos experimentos porque captan el DNA exógeno con gran eficiencia y se transforman con facilidad en células malignas en cultivo. Después de la transfección con DNA de

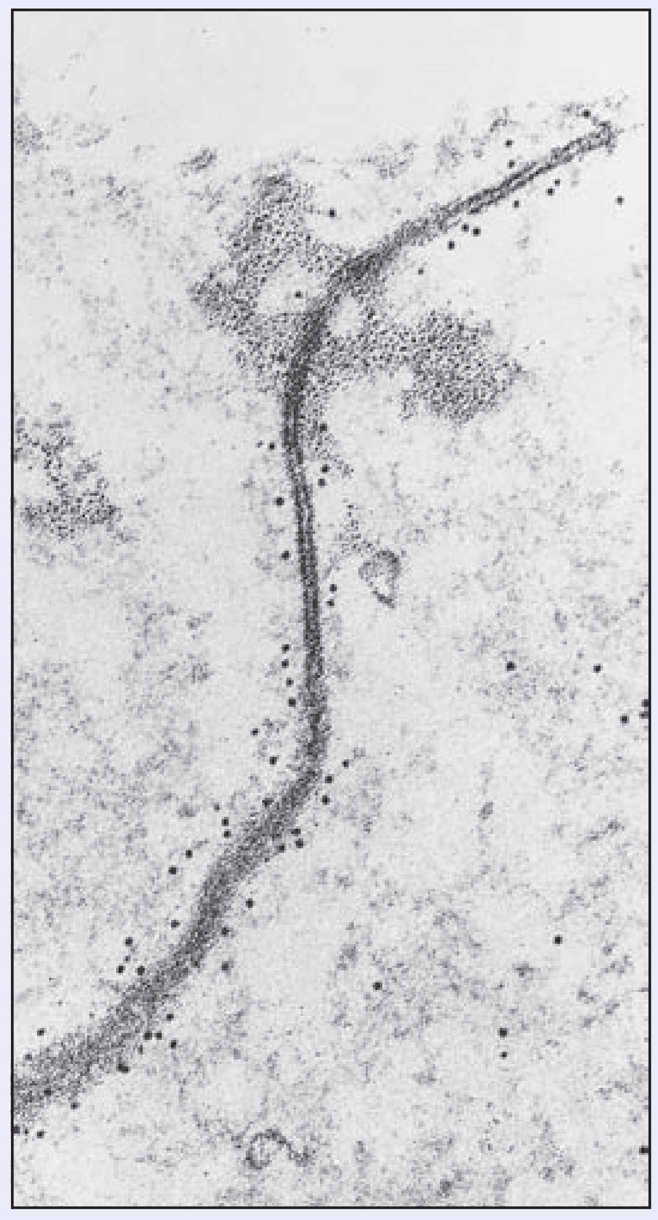


FIGURA 3 Micrografía electrónica de un corte a través de un par de fibroblastos adyacentes que se habían tratado con anticuerpos marcados con ferritina contra la proteína pp60^{src}. La proteína se localiza (como lo muestran los gránulos densos de ferritina) en la membrana plasmática de la célula y se concentra sobre todo en los sitios con uniones comunicantes. (Tomada de Mark C. Willingham, Gilbert Jay e Ira Pastan, Cell 18:128, 1979, con autorización de Cell Press.)

las células tumorales, los fibroblastos se cultivan in vitro y se evalúan los cultivos en busca de cúmulos (focos) que contengan células transformadas por el DNA agregado. De las 15 líneas celulares probadas, cinco produjeron DNA que transformarían a las células NIH3T3 receptoras. El DNA de las células normales no tenía esta capacidad. Estos resultados demostraron que las sustancias carcinógenas causaban alteraciones en las secuencias de nucleótidos de los genes que conferían a los genes alterados la capacidad de transformar a otras células. Por lo tanto, los genes celulares podían convertirse en oncogenes de dos formas distintas: como resultado de incorporarse en el genoma de un virus o mediante la alteración con sustancias carcinógenas.

Hasta este momento, todos los estudios con genes causantes de cáncer se han realizado en ratones, pollos u otros organismos cuyas células son muy sensibles a la transformación. En 1981, la atención se desvió hacia el cáncer humano cuando se demostró que el DNA aislado de células tumorales humanas podía transformar las células NIH3T3 de ratón después de la transfección.[13] De 26 distintos tumores humanos que se probaron en este estudio, dos proporcionaron DNA capaz de transformar los fibroblastos de ratón. En ambos casos, el DNA se había extraído de líneas celulares tomadas de un carcinoma vesical (identificadas como EJ y J82). Se hicieron grandes esfuerzos para establecer si los genes provenían de un virus tumoral, pero no se detectó evidencia de DNA vírico en estas células. Tales resultados suministraron la primera evidencia de que algunas células humanas contienen un oncogén activado que puede transmitirse a otras células e inducir su transformación.

El descubrimiento de que el cáncer puede transmitirse de una célula a otra por fragmentos de DNA estableció la base para determinar qué genes de una célula causan la transformación maligna cuando se activan mediante una mutación u otro mecanismo. Para efectuar esta identificación fue necesario aislar el DNA que captan las células e inducen su transformación. Una vez que se aisló el DNA ajeno causante de la transformación, pudo analizarse en busca de la presencia de los alelos causantes del cáncer. En 1982, con una diferencia de dos meses entre cada uno, tres laboratorios distintos informaron el aislamiento y clonación de un gen no identificado de las células del carcinoma vesical humano que podía transformar los fibroblastos NIH3T3 de ratón.[14-16]

Luego de aislar y clonar el gen transformador del cáncer vesical humano, el siguiente paso era determinar si ese gen tenía alguna relación con los oncogenes portados por los virus tumorales de RNA. Una vez más, con dos meses de diferencia entre cada uno, se publicaron tres documentos de distintos laboratorios que notificaban resultados similares.[17-19] Los tres mostraban que el oncogén de los carcinomas vesicales humanos que transforman las células NIH3T3 es el mismo oncogén (llamado *ras*) que porta el virus del sarcoma de Harvey, un virus tumoral de rata de RNA. Las comparaciones preliminares de las dos versiones de *ras*, la versión vírica y su homólogo celular, no mostraron diferencia alguna, lo que indica que los dos genes son muy similares o idénticos. Estos descubrimientos indicaron que los diferentes tipos de cáncer que se desarrollan de manera espontánea en la población humana se deben a una alteración genética similar a los cambios en las células que se habían transformado por efecto vírico en el laboratorio. Es importante señalar que los tipos de cáncer inducidos por el virus del sarcoma de Harvey (sarcomas y eritroleucemias) son muy distintos a los de tumores vesicales, que poseen un origen epitelial. Esta fue la primera indicación de que las alteraciones en el mismo gen humano (*RAS*) puede propiciar una gran variedad de tumores distintos.

Para finales de 1982, tres documentos adicionales de diversos laboratorios comunicaron cambios precisos en el gen *RAS* humano que inducen la activación de un oncogén.[20-22] Una vez que se identificó la sección del gran fragmento de DNA causante de la transformación, el análisis de la secuencia de nucleótidos señaló que el DNA de las células vesicales malignas se activa como resultado de una sola sustitución de base dentro de la región codificadora del gen. Un hecho notable es que ambos carcinomas vesicales humanos estudiados (identificados como EJ y T24) contienen DNA con la misma alteración: un nucleótido con guanina en un sitio específico en el DNA de un protooncogén se había convertido en una timidina en el oncogén activado. Esta sustitución de base produce la reposición de una valina por una glicina como el duodécimo residuo de aminoácido del polipéptido.

La identificación de la secuencia de nucleótidos del gen v-*ras* que porta el virus del sarcoma Harvey reveló una alteración en la secuencia de bases que afectaba justo al mismo codón que se modificaba en el

DNA de los carcinomas vesicales humanos. El cambio del gen vírico sustituye una arginina por la glicina normal. Parecía que este residuo particular de glicina mostraba un papel crítico en la estructura y función de esta proteína. Es interesante señalar que el gen *RAS* humano es un protooncogén que, como *SRC*, puede activarse mediante la unión con un promotor vírico. Por lo tanto, *RAS* puede activarse para inducir la transformación por dos vías diferentes: un aumento de su expresión o una alteración de la secuencia de aminoácidos de su polipéptido habitual.

La investigación descrita en esta Vía experimental representó un gran salto hacia la comprensión de la base genética de la transformación maligna. Gran parte de la investigación inicial de los virus tumorales de RNA derivó de la creencia de que estos agentes pueden ser una causa importante en el desarrollo del cáncer humano. La búsqueda de virus como causa de cáncer condujo al descubrimiento del oncogén, lo cual dio lugar al conocimiento de que éste es una secuencia celular que adquiere el virus, lo que al final llevó al descubrimiento de que el oncogén puede provocar cáncer sin la participación del genoma vírico. Por lo tanto, los virus tumorales, que no intervienen de manera directa en la mayoría de los cánceres humanos, han proporcionado la ventana necesaria por la que puede verse la propia herencia en busca de información que conduzca a la propia ruina.

Referencias

1. Rous, P. 1911. Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. *J. Am. Med. Assoc.* 56:198.
2. Baltimore, D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226:1209–1211.
3. Temin, H. & Mizutani, S. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226:1211–1213.
4. Martin, G. S. 1970. Rous sarcoma virus: A function required for the maintenance of the transformed state. *Nature* 227:1021–1023.
5. Stehelin, D., et al. 1976. Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses. *J. Mol. Biol.* 101:349–365.
6. Stehelin, D., et al. 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260: 170–173.
7. Spector, D. H., Varmus, H. E., & Bishop, J. M. 1978. Nucleotide sequences related to the transforming gene of avian sarcoma virus are present in DNA of uninfected vertebrates. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 75:4102–4106.
8. Purchio, A. F., et al. 1978. Identification of a polypeptide encoded by the avian sarcoma virus src gene. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 1567–1671.
9. Collett, M. S. & Erikson, R. L. 1978. Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 75:2021–2924.
10. Willingham, M. C., Jay, G., & Pastan, I. 1979. Localization of the ASV src gene product to the plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry. *Cell* 18:125–134.
11. Hunter, T. & Sefton, B. M. 1980. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 77:1311–1315.
12. Shih, C., et al. 1979. Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 76:5714–5718.
13. Krontiris, T. G. & Cooper, G. M. 1981. Transforming activity of human tumor DNAs. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1181–1184.
14. Goldfarb, M., et al. 1982. Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. *Nature* 296:404–409.
15. Shih, C. & Weinberg, R. A. 1982. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* 29:161–169.
16. Pulciani, S., et al. 1982. Oncogenes in human tumor cell lines: Molecular cloning of a transforming gene from human bladder carcinoma cells. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 79:2845–2849.
17. Parada, L. F., et al. 1982. Human EJ bladder carcinoma oncogene is a homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297:474–478.
18. Der, C. J., et al. 1982. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 79:3637–3640.
19. Santos, E., et al. 1982. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* 298:343–347.
20. Tabin, C. J., et al.1982. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300:143–149.
21. Reddy, E. P., et al. 1982. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300:149–152.
22. Taparowsky, E., et al. 1982. Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* 300:762–765.

SINOPSIS

El cáncer es una enfermedad que incluye defectos heredables en los mecanismos de control celular que conducen a la formación de tumores invasivos capaces de liberar células que diseminan la enfermedad a sitios distantes del cuerpo. Muchas de las características de las células tumorales pueden observarse en cultivo. En tanto que las células normales proliferan hasta que forman una sola capa (monocapa) sobre el fondo de la caja de cultivo, las células cancerosas continúan su crecimiento en cultivo y se acumulan unas sobre otras para formar cúmulos. Otras propiedades frecuentes de las células cancerosas incluyen un número anormal de cromosomas, la capacidad para continuar las divisiones de manera indefinida y la falta de respuesta a las células contiguas (pág. 663).

Las células normales pueden convertirse en células cancerosas mediante el tratamiento con una gran variedad de sustancias, radiación ionizante y diversos virus que contienen DNA y RNA; todos estos agentes actúan mediante la inducción de cambios en el genoma de la célula transformada. El análisis de las células de un tumor canceroso casi siempre muestra que las células provienen del crecimiento de una sola célula (se dice que el tumor es monoclonal). El desarrollo de un tumor maligno es un proceso de múltiples pasos caracterizado por una progresión de alteraciones genéticas que reducen cada vez más la capacidad de respuesta de la célula a la maquinaria reguladora normal del cuerpo e incrementan la de invadir tejidos normales. Los genes participantes en la carcinogénesis constituyen un subgrupo específico del

genoma cuyos productos intervienen en actividades como el control del ciclo celular, adhesión intercelular y reparación de DNA. El nivel de expresión de genes particulares en distintos tipos de cánceres puede identificarse mediante microseries de DNA. Además de la alteración genética, el crecimiento de las células tumorales también depende de influencias no genéticas y epigenéticas que permiten a la célula expresar su fenotipo maligno (pág. 665).

Los genes que intervienen en la carcinogénesis se dividen en dos grandes categorías: genes supresores de tumores y oncogenes. Los genes supresores tumorales codifican proteínas que limitan el crecimiento celular e impiden que la célula se vuelva maligna. Los genes supresores tumorales actúan en forma recesiva porque deben eliminarse o mutarse ambas copias antes de perder su función protectora. Por el contrario, los oncogenes codifican proteínas que fomentan la pérdida del control de crecimiento y la malignidad. Los oncogenes provienen de los protooncogenes, genes que codifican proteínas que participan en las actividades normales de la célula. Las mutaciones que alteran la proteína o su expresión hacen que los protooncogenes actúen de manera anormal y promuevan el desarrollo de un tumor. Los oncogenes actúan de manera dominante, esto es, que una sola copia hace que la célula exprese el fenotipo alterado. La mayoría de los tumores contienen alteraciones en los genes supresores tumorales y los oncogenes. Mientras la célula conserve al menos una copia de todos estos genes supresores tumorales, debe estar protegida contra las consecuencias de la aparición de un oncogén. Por el contrario, la pérdida de una función supresora tumoral no debe ser suficiente por sí sola para que la célula se torne maligna (pág. 670).

El primer gen supresor tumoral que se identificó fue *RB*, causante de un raro tumor retiniano llamado retinoblastoma, muy frecuente en ciertas familias, aunque también puede aparecer de manera esporádica. Los niños con la forma familiar de la enfermedad heredan una copia mutada del gen. Estas personas desarrollan el cáncer sólo después de un daño esporádico en el segundo alelo en una de las células de la retina. *RB* codifica una proteína llamada pRb que participa en la regulación del paso de una célula de la etapa G_1 a la S en el ciclo celular. La forma no fosforilada de pRb interactúa con ciertos factores de transcripción y previene que éstos se unan con el DNA para activar los genes necesarios para ciertas actividades de la fase S. Una vez que pRb se fosforila, la proteína libera su factor de transcripción unido, que entonces puede activar la expresión génica e iniciar la fase S (pág. 673).

El gen supresor tumoral referido con mayor frecuencia en el cáncer humano es *TP53*, cuyo producto (p53) es capaz de suprimir la aparición de cáncer por varios mecanismos distintos. En una de sus acciones, p53 funciona como factor de transcripción que activa la expresión de una proteína (p21) que inhibe la cinasa dependiente de ciclina que hace avanzar a la célula por el ciclo celular. El daño en el DNA inicia la fosforilación y estabilización de p53, lo que conduce a la detención del ciclo celular hasta que se repara el daño. El p53 también puede redirigir a las células que están en camino a la transformación maligna para que sigan una vía alternativa hacia la muerte programada o apoptosis. Los ratones con eliminación de *TP53* empiezan a desarrollar tumores varias semanas después de nacer. Otros genes supresores tumorales incluyen *APC*, que al mutar predispone al individuo a desarrollar cáncer colónico, y *BRCA1* y *BRCA2* que al mutar tornan proclive al sujeto al cáncer mamario (pág. 675).

La mayoría de los oncogenes conocidos derivan de protooncogenes que tienen alguna función en las vías que transmiten señales de crecimiento del ambiente extracelular al interior de la célula, sobre todo el núcleo celular. Se han identificado varios oncogenes que codifican receptores para factores de crecimiento, incluidos los receptores para el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y para el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Es posible que las células malignas contengan una cantidad mucho mayor de alguno de estos receptores para factores de crecimiento en la membrana plasmática en comparación con las células normales. El exceso de receptores torna a la célula sensible a concentraciones menores del factor de crecimiento y por tanto se estimulan para dividirse en condiciones que no influirían en las células normales. Varias cinasas de proteína citoplásmicas, incluidas las cinasas de serina/treonina y las de tirosina, se incluyen en la lista de oncogenes. En este grupo se incluye *RAF*, que codifica una cinasa de proteína en la cascada de cinasa de MAP. Las mutaciones en *RAS* se encuentran entre los oncogenes más frecuentes en los diferentes tipos de cáncer en humanos. Como se explica en el capítulo 15, Ras activa la función de cinasa de proteína de Raf. Si Raf permanece en su estado activado, emite señales continuas por la vía de la cinasa de MAP, lo que conduce a la estimulación continua de la proliferación celular. Varios oncogenes, como *MYC*, codifican proteínas que actúan como factores de transcripción. En condiciones normales, Myc es una de las primeras proteínas en aparecer cuando se estimula a una célula para reingresar al ciclo celular a partir de la fase G_0 quiescente. Otro grupo de oncogenes, como *BCL-2*, codifica proteínas que intervienen en la apoptosis. La expresión excesiva del gen *BCL-2* suprime la apoptosis en los tejidos linfoides, lo que permite que las células anormales proliferen hasta formar tumores linfoides (pág. 679).

Los genes que codifican proteínas participantes en la reparación del DNA también intervienen en la carcinogénesis. El genoma de los sujetos con la forma hereditaria más frecuente de cáncer de colon, llamado cáncer hereditario de colon sin poliposis (HNPCC), contiene secuencias microsatélites con un número anormal de nucleótidos. Los cambios en la longitud de una secuencia microsatélite surgen como un error durante la replicación, que en condiciones normales reconocen las enzimas de reparación de discrepancias, lo que sugiere que los defectos en tales sistemas pueden ser causantes del cáncer. Esta conclusión se apoya con los hallazgos de que los extractos de las células tumorales de HNPCC muestran deficiencias en la reparación del DNA. Se esperaría que las células que contienen tales deficiencias presentaran un nivel muy alto de mutación en los genes supresores tumorales y oncogenes que conducen a un riesgo mucho mayor de malignidad. Determinados microRNA también se han implicado como oncogenes (o supresores tumorales) (pág. 681).

En la actualidad, el cáncer se trata con cirugía, quimioterapia y radiación. Existen varias terapias más en prueba. Pueden mencionarse la inmunoterapia, terapia génica, inhibidores de proteínas codificadas por oncogenes e inhibición de angiogénesis. Hasta ahora, el mayor éxito se ha obtenido con el desarrollo de un inhibidor de la cinasa de Abl en pacientes con leucemia mielógena crónica. Un segundo éxito es el desarrollo de anticuerpos humanizados que se unen con una proteína en la superficie de las células B malignas en casos de linfoma no Hodgkin. Las terapéuticas contra la angiogénesis intentan prevenir que un tumor sólido induzca la formación de los nuevos vasos sanguíneos necesarios para llevar a las células neoplásicas nutrimentos y otros materiales. Se han identificado varios agentes que bloquean la angiogénesis en ratones pero han tenido poco éxito en pruebas clínicas (pág. 682).

SITIO EN INTERNET www.wiley.com/college/karp

Las animaciones y los videos indicados en este capítulo pueden visitarse en el sitio de Cell and Molecular Biology de Karp en Internet. También hallará todas las respuestas a las preguntas analíticas recién planteadas, autoexámenes que le ayudarán a prepararse para los exámenes, y vínculos con fascinantes recursos. La sección lecturas adicionales que sigue se amplía en el sitio en Internet.

LECTURAS ADICIONALES

Blattman, J. N. & Greenberg, P. D. 2004. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses. *Science* 305:200–205.

Brooks, C. L. & Gu, W. 2006. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol. Cell* 21:307–315.

Campisi, J. 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging. *Cell* 120:513–522.

Clarke, M. F. 2004. At the root of brain cancer. *Nature* 432:281–282.

Colditz, G. A., et al. 2006. Epidemiology—identifying the causes and preventability of cancer? *Nature Revs. Cancer* 6:75–83.

Couzin, J. 2003. Tracing the steps of metastasis, cancer's menacing ballet. *Science* 299:1002–1006.

Couzin, J. 2005. A new cancer player takes the stage. *Science* 310:766–767. [miRNA y cáncer.]

Draviam, V. M., et al. 2004. Chromosome segregation and genomic stability. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 14:120–125.

Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J. 2006. Oncomirs—micro RNAs with a role in cancer. *Nature Revs. Cancer* 6:259–269.

Gilboa, E. 2004. The promise of cancer vaccines. *Nature Revs. Cancer* 4:401–411.

Hahn, W. C. & Weinberg, R. A. 2002. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature Revs. Cancer* 2:331–341.

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. 2000.The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70.

Hortobagyi, G. N. 2005. Trastuzumab in the treatment of breast cancer. *New Engl. J.Med.* 353:1734–1736. [herceptina.]

Hunter, T. & Eckhart, W. 2004. The discovery of tyrosine phosphorylation: it's all in the buffer! *Cell* S116:S35–S39.

Kamb, A. 2005. What's wrong with our cancer models? *Nature Revs. Drug Disc.* 4:399–409.

Kiberstis, P. A. et al. 2006. Frontiers in cancer research. *Science* 312:1157–1179.

Levine, A. A., et al. 2004. p53 is a tumor suppressor gene. *Cell* S116: S67–S69.

Marte, B., et al. 2004. Nature insight: Cell division and cancer. *Nature* 432:293–352.

Mehlen, P. & Puisieux, A. 2006. Metastasis: a question of life or death. *Nature Revs. Cancer* 6:449–458.

Offringa, R. 2006. Cancer immunotherapy is more than a number game. *Science* 314:68–69.

O'Hare, T., et al. 2006. Targeted CML therapy: controlling drug resistance, seeking cure. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 16:92–99.

Pastan, I., et al. 2006. Immunotoxin therapy of cancer. *Nature Revs. Cancer* 6:559–564.

Polyak, K. & Hahn, W. C. 2006. Roots and stems: stem cells and cancer. *Nature Med.* 12:296–300.

Rosenberg, S. A., et al. 2004. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature Med.* 20:909–915.

Shaw, R. J., et al. 2006. Articles on signalling in cancer. *Nature* 441:423–462.

Sherr, C. J. 2004. Principles of tumor suppression. *Cell* 116:235–246.

Spinney, L. 2006. Cancer: new fronts in an old war. *Nature* 442:735–743.

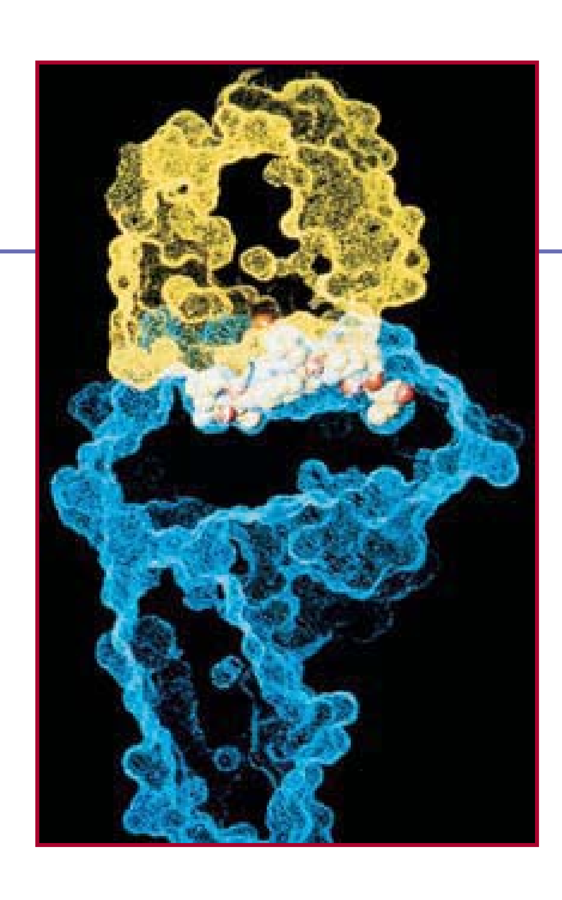
Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Med.* 10:789–799.

Wallace, V. A. 2006. Second step to retinal tumours. *Nature* 444:45–46.

Wang, J. C. Y. & Dick, J. E. 2005. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol.* 15:494–501.

Weinberg, R. A. 2006. *The Biology of Cancer.* Garland.

CAPÍTULO 17



La reacción inmunitaria

Los organismos vivos son el hábitat ideal en el que pueden crecer otros organismos. Por lo tanto, no es sorprendente que los animales estén sujetos a infecciones por virus, bacterias, protistas, hongos y parásitos animales. Los vertebrados desarrollaron varios mecanismos que les permiten reconocer y destruir estos agentes infecciosos. Como resultado, los vertebrados son capaces de desarrollar **inmunidad** contra los patógenos invasores. La inmunidad deriva de las actividades combinadas de muchas células diferentes, algunas de las cuales vigilan el cuerpo mientras que otras se concentran en órganos linfoides, como la médula ósea, timo, bazo y ganglios linfáticos (fig. 17-1). En conjunto, estas células dispersas y órganos discretos forman el **sistema inmunitario** del cuerpo.

Las células del sistema inmunitario participan en un tipo de detección molecular mediante el cual reconocen macromoléculas "extrañas", es decir, aquellas cuya estructura sea diferente a la de las macromoléculas normales del cuerpo. Si se identifica material extraño, el sistema inmunitario establece un ataque específico y concertado contra éste. Las armas del sistema inmunitario incluyen: a) células que destruyen o ingieren a células infectadas o alteradas y b) proteínas solubles que pueden neutralizar, inmovilizar, aglutinar o aniquilar a los patógenos. Este sistema también participa en la lucha del cuerpo

Los linfocitos T son células del sistema inmunitario que se activan cuando entran en contacto con células que presentan péptidos extraños en su superficie. Esta imagen compuesta por computadora muestra porciones de la molécula que participan en esta interacción entre las células. El receptor de la célula T que se proyecta desde el linfocito T aparece en amarillo, la proteína MHC que sobresale de la superficie de una célula infectada en azul y un péptido derivado de un retrovirus humano en blanco. La proteína MHC mantiene sujeto el péptido vírico mientras lo presenta al linfocito T. (Tomada de David N. Garboczi, et al., por cortesía de Don C. Wiley, Harvard University. Reimpresa con autorización de Nature 384:137, 1996; © 1996 por Macmillan Magazines Ltd.)

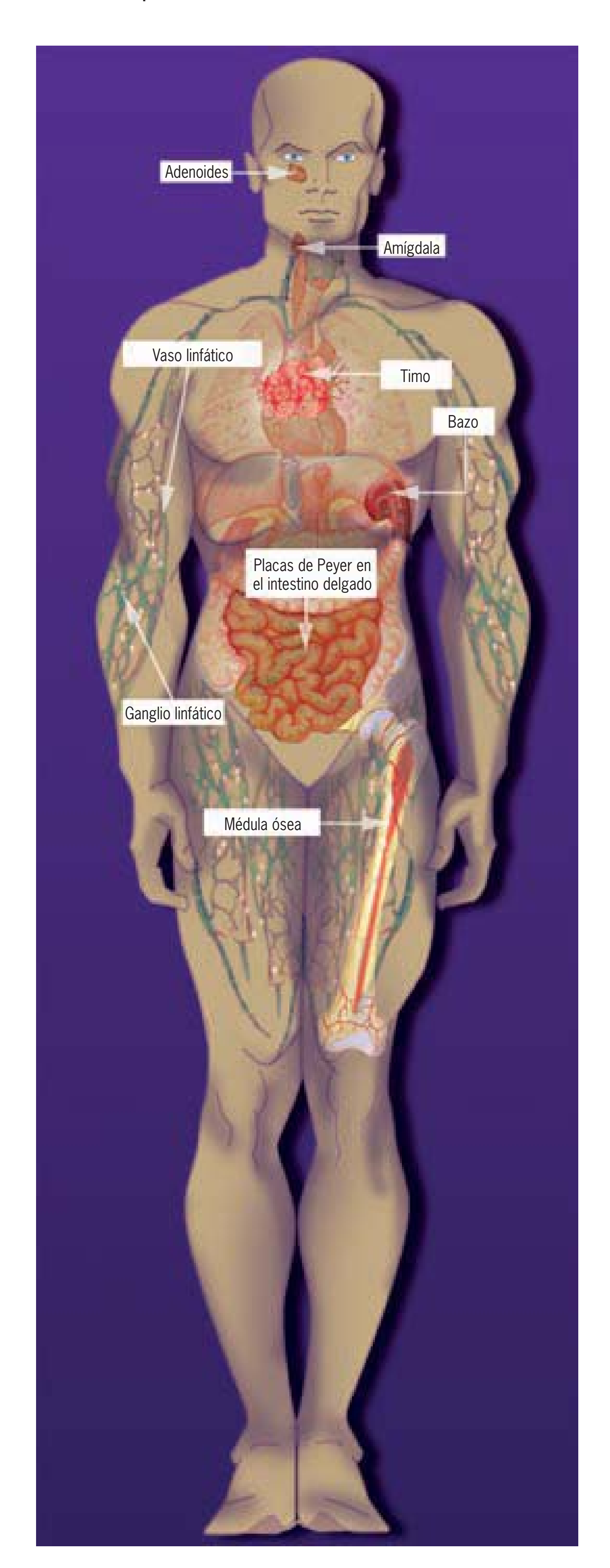


FIGURA 17-1 **El sistema inmunitario** humano incluye varios órganos linfoides, como el timo, médula ósea, bazo, ganglios linfáticos y células dispersas como parches en el intestino delgado, adenoides y amígdalas. El timo y la médula ósea a menudo se describen como el sistema inmunitario central por sus papeles clave en la diferenciación de los linfocitos.

contra el cáncer, pero el grado en el que puede reconocer y matar a las células cancerosas aún es motivo de controversia. En algunos casos, el sistema inmunitario puede establecer una respuesta inapropiada que ataca a los propios tejidos del cuerpo. Como se explica en la sección Perspectiva humana de la página 718, estos incidentes pueden precipitar una enfermedad grave.

Resulta imposible abarcar todo el tema de la inmunidad en un solo capítulo. En lugar de ello, éste se enfoca en varios aspectos seleccionados que ilustran los principios de la biología celular y molecular explicados en los capítulos previos. Sin embargo, antes es necesario examinar los fenómenos básicos de la respuesta corporal ante la presencia de un microbio intruso.[1]

17.1 REVISIÓN DE LA REACCIÓN INMUNITARIA

La superficie externa del cuerpo y los recubrimientos de sus trayectos internos establecen una excelente barrera contra la penetración de virus, bacterias y parásitos. Si se violan estas barreras superficiales, se activan **reacciones inmunitarias** que contienen la invasión. Las respuestas inmunitarias pueden dividirse en dos categorías generales: innatas y adaptativas (o adquiridas). Ambos tipos dependen de la capacidad del cuerpo para distinguir entre los materiales que deben estar ahí (esto es, "nativos") y los que no deben (es decir, "ajenos"). También se pueden diferenciar dos categorías de patógenos: los que se encuentran sobre todo dentro de una célula hospedadora (todos los virus, algunas bacterias y ciertos parásitos protozoarios) y los que se hallan sobre todo en compartimientos extracelulares del hospedador (la mayoría de las bacterias y otros patógenos celulares). Han evolucionado distintos tipos de mecanismos inmunitarios para combatir estas dos clases de infecciones. La figura 17-2 presenta una revisión de algunos de estos mecanismos.

Reacciones inmunitarias innatas

Las **reacciones inmunitarias innatas** son las que establece el cuerpo de inmediato, sin necesidad de un contacto previo con el microbio. Por lo tanto, confieren al cuerpo una primera línea de defensa. Un microbio invasor casi siempre establece el contacto inicial con el sistema inmunitario innato cuando lo encuentra

[1] Antes de iniciar el estudio del sistema inmunitario, vale la pena recordar que muchos animales son capaces de defenderse contra las infecciones víricas sintetizando siRNA que guían la destrucción de RNA bicatenarios víricos. Aunque las células de los vertebrados tienen la maquinaria necesaria para la interferencia de RNA (RNAi) (en virtud de que producen miRNA) y pueden utilizar dsRNA pequeños proporcionados por los investigadores para destruir los genomas víricos (como se expone en la sección Perspectiva humana del capítulo 11), la mayoría de los estudios sugiere que los vertebrados no usan siRNA como mecanismo de defensa antivírico. Aunque este tema dista mucho de estar resuelto, en general se piensa que la evolución de un sistema inmunitario altamente eficaz en los vertebrados primitivos llevó al abandono de la RNAi como arma principal en la continua guerra contra los virus.

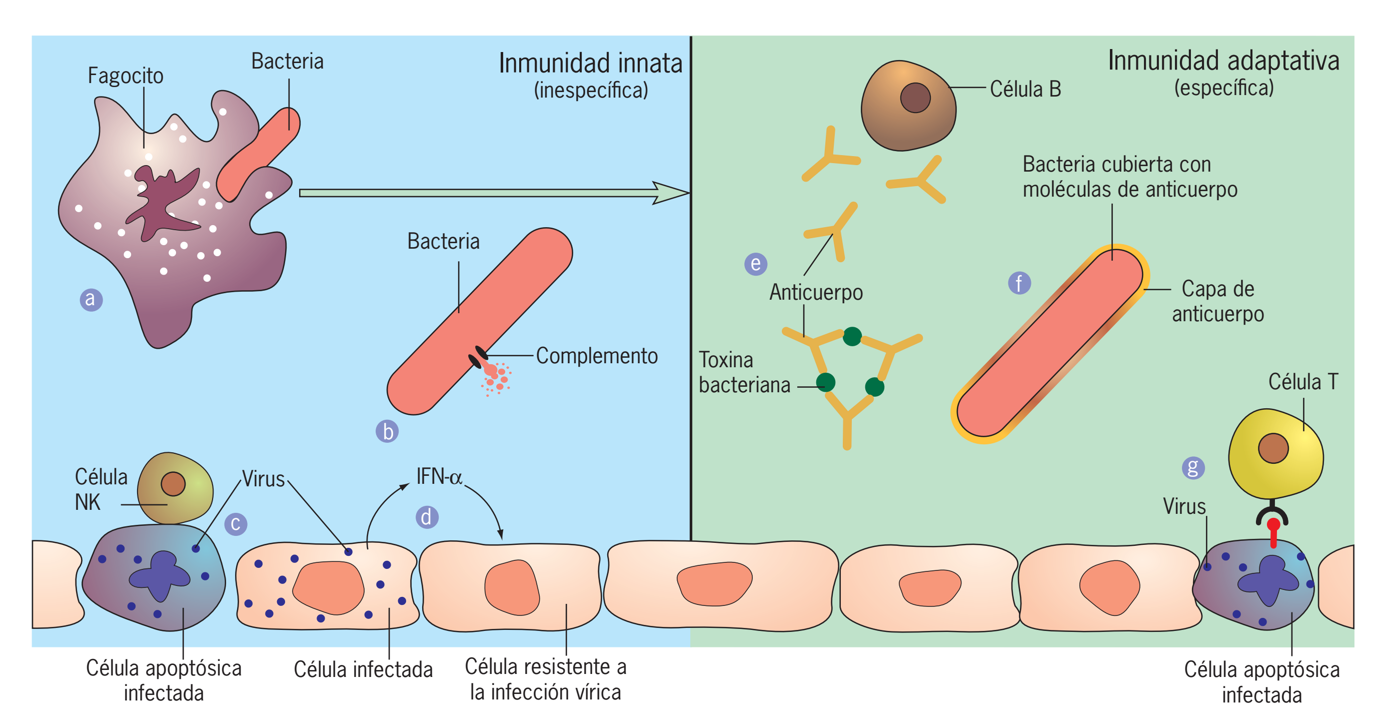


FIGURA 17-2 Revisión de algunos mecanismos por los cuales el sistema inmunitario libera al cuerpo de patógenos invasores. El panel izquierdo muestra varios tipos de inmunidad innata: (a), fagocitosis de una célula bacteriana; (b), destrucción de una célula bacteriana por el complemento; (c), apoptosis inducida en una célula infectada por una célula destructora natural (NK), y (d), inducción de resistencia vírica por el interferón alfa (IFN-α). El panel derecho muestra varios tipos de inmunidad adaptativa: (e), neutralización de una toxina bacteriana mediante un anticuerpo; (f), célula bacteriana cubierta con anticuerpos (opsonizada), lo que la torna susceptible a la fagocitosis o muerte inducida por el complemento, y (g), apoptosis inducida en una célula infectada por un linfocito T activado (célula T). Las respuestas inmunitarias adaptativas y adquiridas están vinculadas entre sí (flecha verde) porque las células, como los macrófagos, que fagocitan a los patógenos utilizan las proteínas ajenas para estimular la producción de anticuerpos específicos y células T dirigidas contra el patógeno. Las células NK también producen sustancias, por ejemplo IFN-γ, que influyen en la respuesta de los linfocitos T.

una célula fagocítica, como un macrófago o una célula dendrítica (fig. 17-9), cuya función es reconocer los objetos extraños y activar la alarma apropiada. Estos fagocitos tienen diversas proteínas receptoras en su superficie que reconocen determinados tipos de macromoléculas altamente conservadas las cuales son características de virus o bacterias y no son producidas por las células del organismo. Se han identificado varios tipos distintos de receptores para patógenos, los más importantes de los cuales son los **receptores tipo Toll** (*Toll-like receptors*, **TLR**). El descubrimiento de los TLR se dio a través de una interesante e inesperada serie de sucesos.

La mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, es bien conocida por su estatus icónico en el campo de la genética, y también por contribuciones clave al estudio del desarrollo y la neurobiología. Pero, como invertebrado, *Drosophila* no se habría considerado un organismo probable para realizar en él un descubrimiento de importancia acerca del funcionamiento del sistema inmunitario humano. Con todo, en 1996 un grupo de investigadores en Francia identificó una mosca de la fruta mutante que era muy susceptible a infecciones micóticas, como es evidente en la fotografía de la figura 17-3. La mosca que ahí se ilustra carece de una proteína llamada Toll, que se había identificado antes como necesaria para el desarrollo de la polaridad dorsoventral ("de arriba abajo") del embrión de la mosca. De hecho, "Toll" es una palabra del eslang alemán que significa "extraño" o "capri-

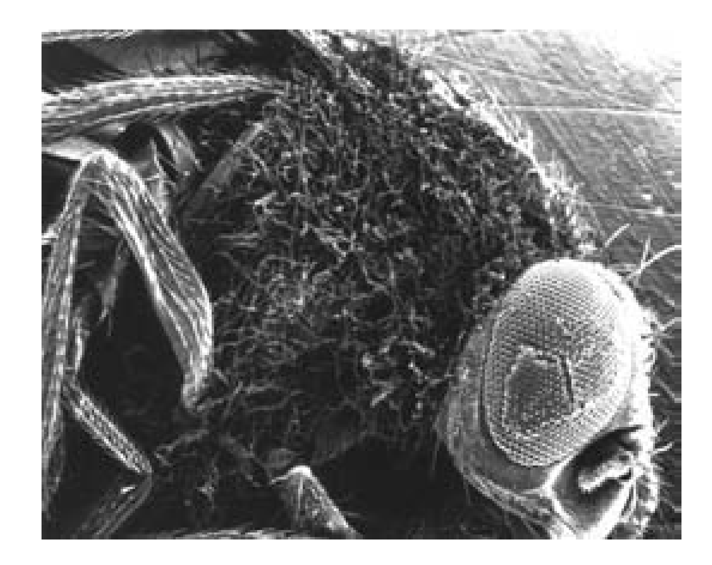


FIGURA 17-3 Micrografía electrónica de barrido de una mosca de la fruta mutante que murió por infección micótica. El cuerpo está cubierto de hifas fungales en germinación. Este individuo era susceptible a las infecciones porque carecía de un gen *Toll* funcional. (Tomada de Bruno Lemaitre, et al., Cell 86:978, 1996; con autorización de Cell Press, cortesía de Jules A. Hoffmann.)

choso", lo cual describe el aspecto embrollado de los embriones de mosca que carecen de un gen *Toll* funcional. Resultó que Toll tiene una función doble en estos animales, como director de la polaridad embrionaria y como factor que promueve la inmunidad contra infecciones. Este descubrimiento llevó a los investigadores a realizar una búsqueda de proteínas similares, esto es, receptores tipo Toll (TLR) en otros organismos. Sucede que el ser humano expresa cuando menos 10 TLR funcionales, todos los cuales son proteínas transmembrana presentes en las superficies (o dentro de determinadas membranas citoplásmicas) de muchos tipos distintos de células. En la familia de TLR humanos hay receptores que reconocen los componentes lipopolisacárido o peptidoglucano de la pared celular bacteriana, la proteína flagelina de los flagelos bacterianos, el RNA (ácido ribonucleico), bicatenario característico de los virus en multiplicación, y dinucleótidos CpG desmetilados (característicos del DNA bacteriano, ácido desoxirribonucleico). La activación de un TLR por una de estas moléculas derivadas de patógeno inicia una cascada de señalización en la célula que puede conducir a diversas reacciones inmunitarias protectoras, incluida la activación de células del sistema inmunitario adaptativo (representado por la flecha verde horizontal en la figura 17-2). Por esta razón, varias compañías farmacéuticas trabajan con fármacos que estimulan al TLR con el objetivo de promover la reacción del organismo contra infecciones tenaces, como la causada por el virus de la hepatitis C. El imiquimod fue aprobado en 1997 y se prescribe contra varios trastornos cutáneos incluidas verrugas genitales; más tarde se descubrió que actúa estimulando un TLR.

Las respuestas innatas ante los patógenos invasores casi siempre se acompañan de un proceso de **inflamación** en el sitio de la infección, del que salen líquido, células y sustancias disueltas de los vasos sanguíneos y se acumulan en los tejidos afectados (pág. 259). Estos fenómenos se acompañan de enrojecimiento local, aumento de volumen y fiebre. La inflamación representa un medio para concentrar los agentes defensivos del cuerpo en el sitio donde se necesitan. Durante la inflamación, las células fagocíticas salen de la corriente sanguínea y migran hacia el sitio de infección como reacción a las sustancias químicas (quimioatrayentes) liberadas en el sitio (pág. 379). Una vez ahí, estas células reconocen, atrapan y destruyen al patógeno (fig. 17-2*a*). La inflamación es un arma de dos filos. Aunque protege al organismo contra patógenos invasores, si no termina de manera oportuna puede dañar los tejidos normales del cuerpo y causar enfermedad crónica. La regulación de la inflamación es un proceso complejo y mal comprendido que implica un equilibrio entre actividades proinflamatorias y antiinflamatorias.

Varios otros mecanismos también están encaminados a atacar patógenos extracelulares. Tanto células epiteliales como linfocitos secretan una variedad de péptidos antimicrobianos, llamados *defensinas*, que son capaces de unirse a virus, bacterias u hongos y causar su destrucción. La sangre también contiene un grupo de proteínas solubles llamadas **complemento** que se unen con los patógenos extracelulares, lo que precipita su destrucción. En una de las vías del complemento, un ensamble activado de estas proteínas perfora la membrana plasmática de una célula bacteriana, lo que conduce a la lisis y muerte celulares (fig. 17-2*b*).

Las reacciones innatas contra los patógenos intracelulares, como los virus, se dirigen sobre todo contra células que ya están infectadas. Las células infectadas con ciertos virus se reconocen por un tipo de linfocito inespecífico llamado **célula destructora natural** (**NK**). Como su nombre indica, las células NK producen la muerte de la célula infectada (fig. 17-2*c*). La célula NK induce a la célula infectada a dirigirse a la apoptosis (pág. 653). Las células NK también aniquilan ciertos tipos de células cancerosas in vitro (fig. 17-4) y es posible que representen un mecanismo para destruir tales células antes de formar un tumor. Las células normales (no infectadas y no malignas) tienen moléculas superficiales que las protegen del ataque de las células NK (véase fig. 17-23).

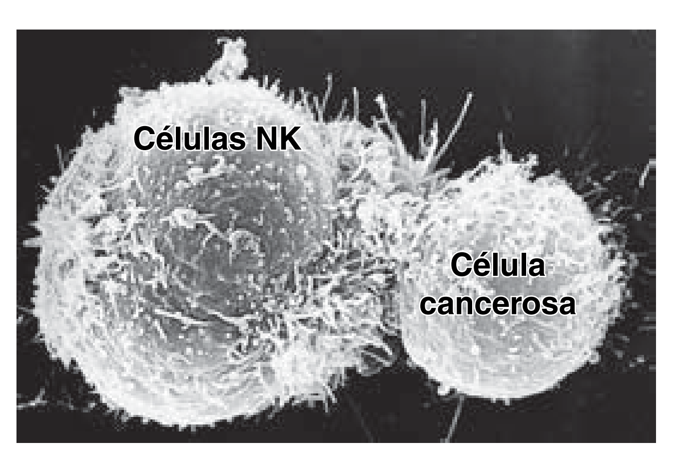


FIGURA 17-4 Inmunidad innata. Micrografía electrónica de barrido de una célula destructora natural unida con la célula blanco, en este caso es una célula maligna de eritroleucemia. Las células NK destruyen sus blancos mediante el mismo mecanismo descrito para los linfocitos T citotóxicos en la página 702. (Por cortesía de Giuseppe Arancia, Departamento de Ultraestructuras, Instituto Superiore di Sanitá, Roma. Tomada de Blood Cells 17:165, 1991.)

Otro tipo de respuesta antivírica innata se inicia dentro de la misma célula infectada. Las células infectadas por virus producen sustancias llamadas *interferones* tipo 1 (interferones alfa y beta) que se liberan al espacio extracelular, donde se unen a la superficie de células no infectadas que las vuelven resistentes a una infección posterior (fig. 17-2*d*). Los interferones realizan esta tarea por varios medios, incluida la activación de una vía de transducción de señal que conduce a la fosforilación y desactivación subsecuente del factor de traducción eIF2 (pág. 471). Las células que tuvieron esta respuesta no pueden sintetizar las proteínas víricas necesarias para la replicación vírica.

Los sistemas inmunitarios, innato y adaptativo no funcionan de manera independiente, sino que trabajan en conjunto para destruir a los invasores externos. Lo más importante es que las mismas células fagocíticas que activan una reacción innata inmediata son las encargadas de precipitar la reacción inmunitaria adaptativa más específica y mucho más lenta.

Reacciones inmunitarias adaptativas

A diferencia de las respuestas innatas, las **reacciones inmunitarias adaptativas** (o **adquiridas**) requieren un periodo durante el cual el sistema inmunitario se prepara para un ataque contra el agente extraño. Al contrario de las respuestas innatas, las adap-

tativas son muy específicas y pueden discriminar entre dos moléculas muy similares. Por ejemplo, la sangre de una persona que acaba de recuperarse del sarampión contiene anticuerpos que reaccionan contra el virus que causa el sarampión, pero no con un virus relacionado, como el que ocasiona la parotiditis. A diferencia del sistema innato, el adaptativo además tiene "memoria", lo cual casi siempre significa que la persona no sufrirá de nueva cuenta la infección por el mismo patógeno en su vida.

En tanto que todos los animales tienen algún tipo de inmunidad innata contra microbios y parásitos, se sabe que sólo los vertebrados establecen una reacción adaptativa. Hay dos grandes categorías de inmunidad adaptativa:

- **Inmunidad humoral**, que se establece mediante **anticuerpos** (fig. 17-2*e*, *f*). Los anticuerpos son proteínas sanguíneas globulares de la **superfamilia de la inmunoglobulina (IgSF)**.
- **Inmunidad mediada por células**, que realizan algunas células (fig. 17-2*g*).

Ambos tipos de inmunidad adaptativa tienen la mediación de los **linfocitos**, que son leucocitos (glóbulos blancos) nucleados que circulan entre la sangre y los órganos linfoides. La inmunidad humoral depende de **linfocitos B** (o **células B**) que, cuando se activan, se diferencian en células que secretan anticuerpos. Estos últimos se dirigen sobre todo contra materiales ajenos que se sitúan fuera de las células del cuerpo. Tales materiales incluyen los componentes proteicos y polisacáridos de las paredes celulares bacterianas, toxinas bacterianas y proteínas de la cubierta vírica. En algunos casos, los anticuerpos pueden unirse con una toxina bacteriana o partícula vírica y previenen la entrada del agente en una célula hospedadora (fig. 17-2*e*). En otros casos, los anticuerpos funcionan como "colgajos moleculares" que se unen con un patógeno invasor y lo marcan para su destrucción. En poco tiempo los fagocitos errabundos ingieren a las células bacterianas cubiertas con moléculas de anticuerpo (fig. 17-2*f*) o las destruyen moléculas de complemento que se encuentran en la sangre. Los anticuerpos no son efectivos contra patógenos que se hallen dentro de las células y de ahí la necesidad de un segundo tipo de sistema de armamento. La inmunidad mediada por células la realizan los **linfocitos T** (o **células T**) que al activarse pueden reconocer y destruir en forma específica a una célula infectada (o ajena) (fig. 17-2*g*).

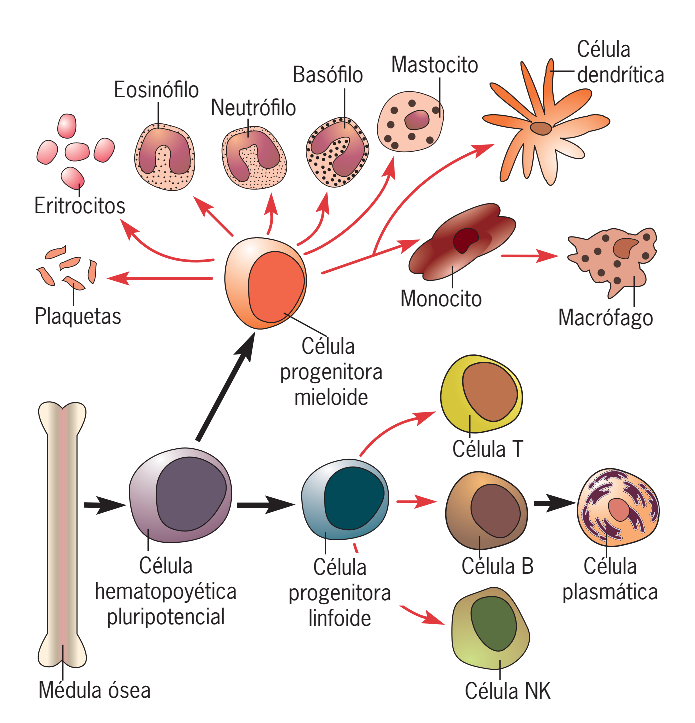


FIGURA 17-5 Vías de diferenciación de una célula germinal hematopoyética pluripotencial de la médula ósea. Una célula germinal hematopoyética puede dar origen a dos células progenitoras diferentes: una célula progenitora mieloide que se diferencia en la mayoría de las células sanguíneas diversas (p. ej., eritrocitos, basófilos y neutrófilos), macrófagos o células dendríticas, o una célula progenitora linfoide que puede diferenciarse en cualesquiera de los diversos tipos de linfocitos (células NK, células B o células T). Las precursoras de células T migran al timo, donde se diferencian en células T. En cambio, las células B se diferencian en la médula ósea.

Las células B y T provienen del mismo tipo de célula precursora (una *célula hematopoyética pluripotencial*), pero se separan por vías distintas en diferentes órganos linfoides. La figura 17-5 presenta un resumen de las diversas vías de diferenciación de la célula hematopoyética pluripotencial. Los linfocitos B se diferencian en el hígado fetal o la médula ósea del adulto, mientras que los linfocitos T lo hacen en el timo, un órgano localizado en el tórax que alcanza su mayor tamaño durante la infancia. A causa de estas diferencias, la inmunidad mediada por células y la humoral pueden disociarse en gran medida. Por ejemplo, es posible que los seres humanos sufran una rara enfermedad llamada agammaglobulinemia congénita en la que hay deficiencia de anticuerpos humorales, pero la inmunidad mediada por células se conserva normal.

REVISIÓN ?

1. Compare y analice las propiedades generales de las reacciones inmunitarias innatas y adaptativas.
2. Mencione cuatro tipos de respuestas inmunitarias innatas. ¿Cuál sería la más efectiva contra un patógeno dentro de una célula infectada?
3. ¿Qué significan los términos inmunidad "humoral" y "mediada por células"?

17.2 LA TEORÍA DE LA SELECCIÓN CLONAL APLICADA A LAS CÉLULAS B

Si una persona se infecta con un virus o se expone a un material extraño, poco después su sangre contiene una elevada concentración de anticuerpos capaces de reaccionar contra la sustancia extraña, que se conoce como **antígeno**. La mayoría de los antígenos consisten en proteínas o polisacáridos, pero los lípidos y los ácidos nucleicos también pueden tener esta capacidad. ¿Cómo puede el cuerpo producir anticuerpos que reaccionan *específicamente* contra un antígeno al cual se expuso el cuerpo? En otras palabras, ¿de qué manera un antígeno induce una reacción inmunitaria adaptativa? Durante muchos años se pensó que los antígenos instruían de alguna manera a los linfocitos para pro-

ducir anticuerpos complementarios. Se sugirió que un antígeno envolvía a una molécula de anticuerpo y la moldeaba hasta una forma capaz de combinarse con ese antígeno particular. En este modelo "instructivo", el linfocito sólo obtiene su capacidad para producir un anticuerpo específico después de su contacto inicial con el antígeno. En 1955, Niels Jerne, un inmunólogo danés, propuso un mecanismo muy diferente. Jerne sugirió que el cuerpo produce pequeñas cantidades de anticuerpos con estructuras aleatorias en ausencia de cualquier antígeno. Como grupo, estos anticuerpos serían capaces de combinarse con cualquier tipo de antígeno al cual pudiera exponerse la persona algún día. De acuerdo con el modelo de Jerne, cuando una persona se expone a un antígeno, éste se combina con un anticuerpo específico, el cual de alguna manera conduce a la producción posterior de esa molécula de anticuerpo particular. Por lo tanto, en el modelo de Jerne el antígeno *selecciona* los anticuerpos preexistentes capaces de unirse con él. En 1957, el inmunólogo australiano F. MacFarlane Burnet extendió el concepto de selección antigénica de los anticuerpos hasta un modelo completo de formación de anticuerpos. La **teoría de selección clonal** de Burnet ganó pronto una gran aceptación. La figura 17-6 muestra una revisión de los pasos que ocurren durante la selección clonal de las células B. Más adelante en el capítulo se presenta una descripción más detallada de estos fenómenos. La selección clonal de las células T se describe en la sección siguiente. Las principales características de la selección clonal de las células B son las siguientes:

1. ***Cada célula B se compromete para producir una especie de anticuerpo.*** Las células B surgen de una población de células progenitoras no diferenciadas e indistinguibles. Conforme se diferencia, la célula B se compromete como resultado de reajustes en el DNA (véase fig. 17-16) para producir sólo una especie de molécula de anticuerpo (fig. 17-6, paso 1). Hay miles de distintos reajustes de DNA posibles, por lo que las distintas células B producen diferentes moléculas de anticuerpo. En consecuencia, aunque las células B maduras parezcan idénticas al microscopio, pueden distinguirse por los anticuerpos que producen.
2. ***Las células B se comprometen con la formación de anticuerpo en ausencia de antígeno.*** Todo el repertorio de células productoras de anticuerpos que tendrá una persona en toda su vida ya existe en los tejidos linfoides antes de la *estimulación por un antígeno* y es independiente de la presencia de materiales extraños. Cada célula B presenta su anticuerpo particular en su superficie, con la porción que reacciona con el antígeno dirigida hacia afuera. Como resultado, la célula está cubierta con receptores para antígenos que pueden unirse de manera específica con antígenos con una estructura complementaria. Aunque la mayoría de las células linfoides nunca son necesarias durante la vida de un individuo, el sistema inmunitario está preparado para responder de inmediato a cualquier antígeno al que se exponga un sujeto. La presencia de células con distintos anticuerpos unidos con la membrana puede demostrarse de manera experimental, como se muestra en la figura 17-7.
3. ***La producción de anticuerpos sigue a la selección de las células B por el antígeno.*** En la mayoría de los casos, la activación de una célula B por un antígeno requiere la participación de las células T (se explica en las páginas 702 y 717). Sin embargo, unos cuantos antígenos, como los polisacáridos presentes en las paredes celulares bacterianas, activan a las células B por sí

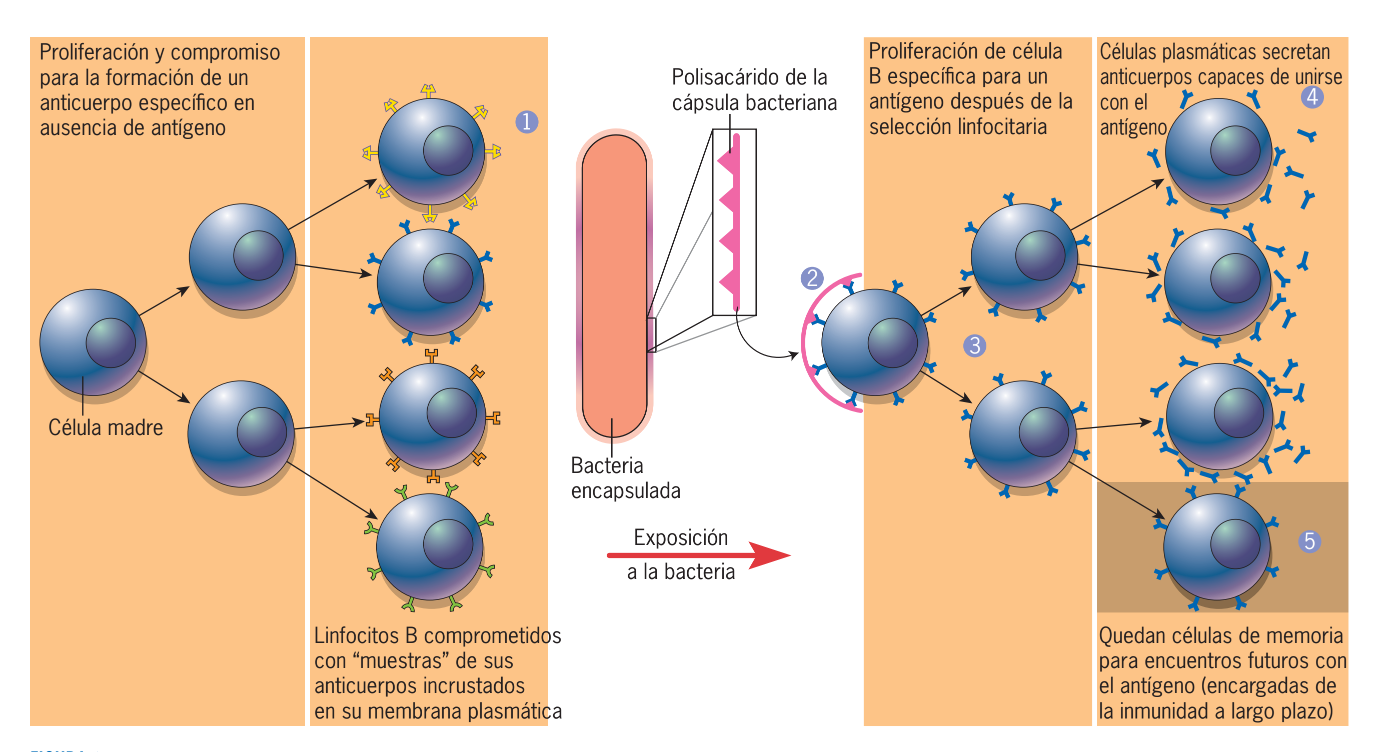


FIGURA 17-6 Selección clonal de las células B por un antígeno independiente del timo. Los pasos se describen en la figura y también en el texto.

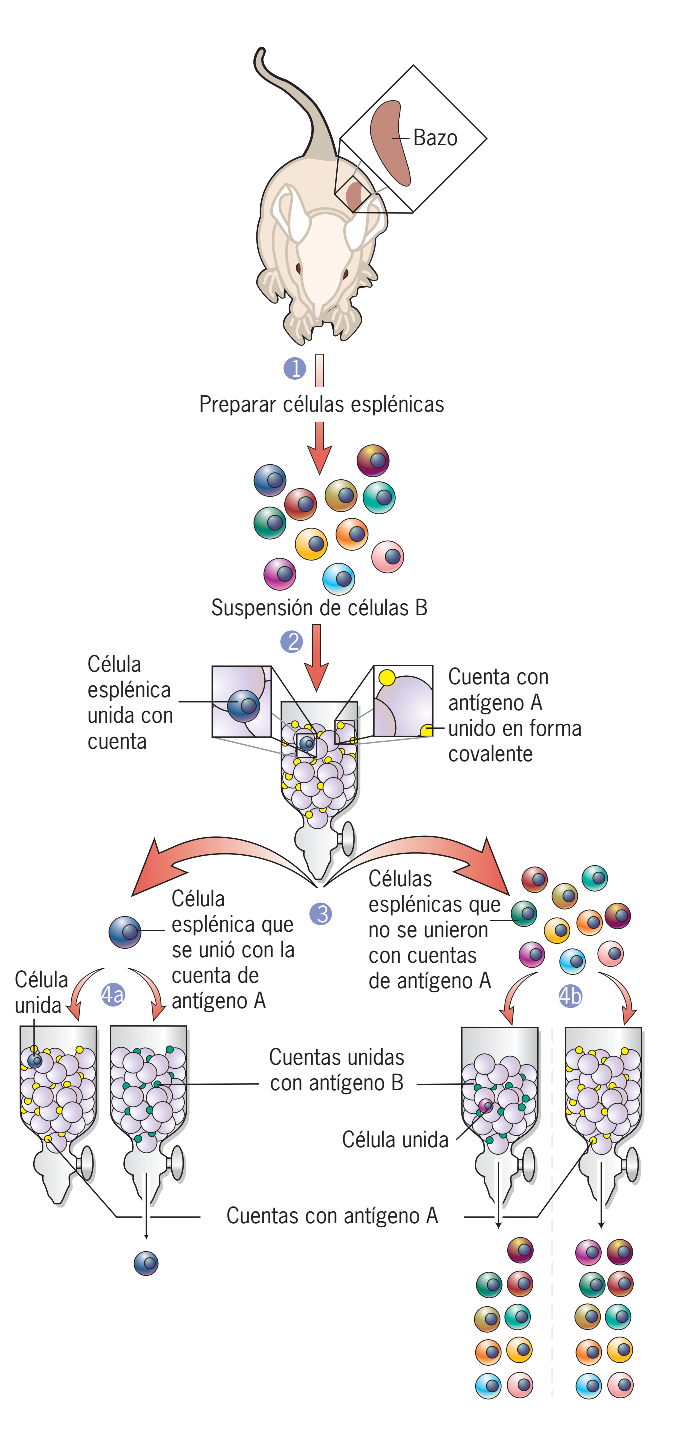
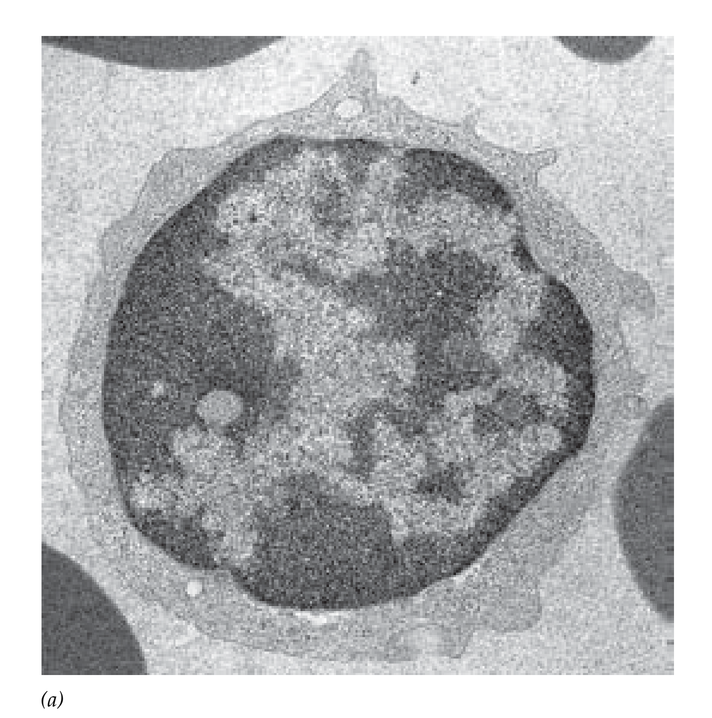
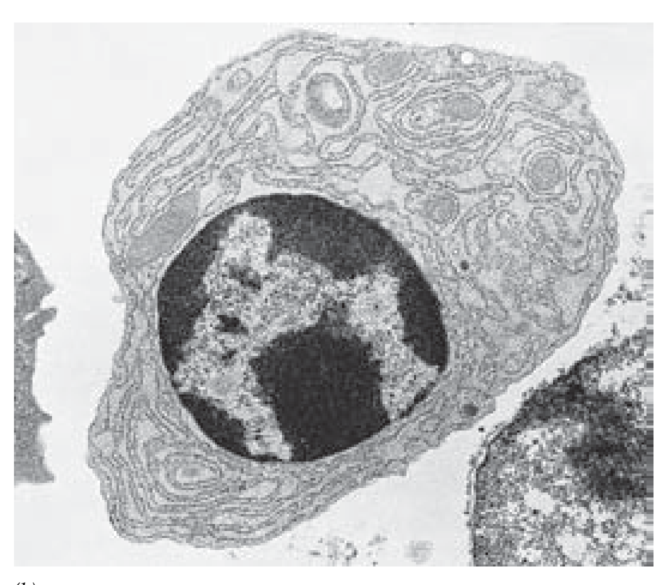


FIGURA 17-7 Demostración experimental de que las diferentes células B contienen un anticuerpo diferente unido a la membrana y que estos anticuerpos se producen en ausencia de antígeno. En este experimento se prepararon células B a partir de un bazo de ratón (paso 1). En el paso 2, las células esplénicas se pasan por una columna que contiene cuentas cubiertas con un antígeno (antígeno A) al cual el ratón nunca se había expuesto. Una diminuta fracción de las células esplénicas se une con las cuentas, mientras que la gran mayoría pasa directamente por la columna (mostrado en el paso 3). En el paso 4, las células esplénicas del experimento previo se pasan por una de dos columnas distintas: una tiene cuentas cubiertas con antígeno A o una con cuentas cubiertas con un antígeno no relacionado (antígeno B), al cual el ratón nunca se había expuesto. En el paso 4a, las células esplénicas valoradas son las que se unieron con las cuentas en el paso previo. Se observa que estas células se unen otra vez con cuentas cubiertas con antígeno A, pero no con las cubiertas con el antígeno B. En el paso 4b, las células esplénicas probadas son las que no se unen con las cuentas en el paso previo. Ninguna de estas células se une con cuentas cubiertas con antígeno A, pero una fracción diminuta se une con las cuentas cubiertas con antígeno B.

mismos; los antígenos de este tipo se describen como *antígenos independientes del timo*. Para simplificar la descripción, por ahora se limitará a un antígeno independiente del timo. Considérese que una persona se expusiera a *Haemophilus influenzae* tipo B, una bacteria encapsulada que puede ocasionar meningitis fatal. La cápsula de estas bacterias contiene un polisacárido que puede unirse con una fracción diminuta de las células B del cuerpo (fig. 17-6, paso 2). Las células B que se unen con el polisacárido contienen anticuerpos unidos con la membrana cuyo sitio de combinación les permite interactuar de manera específica con ese antígeno. De esta forma, un antígeno *selecciona* a los linfocitos que producen anticuerpos capaces de interactuar con dicho antígeno. La unión con el antígeno activa a la célula B e induce su proliferación (fig. 17-6, paso 3) para formar una población (o *clon*) de linfocitos, los cuales producen el mismo anticuerpo. Algunas de estas células activadas se diferencian en **células plasmáticas** de vida corta que secretan grandes cantidades de moléculas de anticuerpo (fig. 17-6, paso 4). A diferencia de los precursores de células B (fig. 17-8*a*), las células plasmáticas tienen un retículo endoplásmico rugoso extenso, característico de las células especializadas en la síntesis y secreción de proteínas (fig. 17-8*b*).

4. ***La memoria inmunológica proporciona inmunidad a largo plazo.*** No todos los linfocitos B que se activan por antígenos se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Algunos permanecen en los tejidos linfoides en la forma de *células B de memoria* (fig. 17-6, paso 5) que pueden responder con rapidez en alguna fecha posterior si el antígeno aparece de nuevo en el cuerpo. Aunque las células plasmáticas mueren después que se elimina el estímulo antigénico, las células B de memoria persisten durante toda la vida de una persona. Cuando se estimulan con el mismo antígeno, algunas de las células B de memoria proliferan en poco tiempo para convertirse en células plasmáticas, con lo que se genera una *reacción inmunitaria secundaria* en cuestión de horas, y no de días, como se necesitó para la respuesta original (véase fig. 17-11).
5. ***La tolerancia inmunológica previene la producción de anticuerpos contra sí mismo.*** Como se explica más adelante, los genes que codifican anticuerpos se generan mediante un proceso en el cual los segmentos de DNA se combinan en forma aleatoria. Como resultado, siempre se forman genes que codifican anticuerpos que pueden reaccionar con los propios tejidos del cuerpo, lo cual daría lugar a la destrucción hística diseminada con la enfermedad consecuente. Es obvio que el cuerpo debe prevenir la producción de tales proteínas, llamadas **autoanticuerpos**, en interés de sí mismo. Durante su desarrollo, muchas de las células B capaces de producir autoanticuerpos se destruyen o desactivan. Como efecto, el cuerpo desarrolla una *tolerancia inmunológica* hacia sí mismo.





(a) (b)

FIGURA 17-8 Comparación de la estructura de una célula B (*a*) y una célula plasmática (*b*). La célula plasmática tiene un compartimiento citoplásmico mucho más grande que la célula B, con más mitocondrias y un retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado. Estas características reflejan la síntesis de grandes cantidades de moléculas de anticuerpo en la célula plasmática. (*A,* © Vu/David Phillips/Visuals Unlimited. *B*, © Vu/K. G. Murti/Visuals Unlimited.)

Como se explica en la sección Perspectiva humana de este capítulo, una falla en el estado de tolerancia puede conducir al desarrollo de enfermedades autoinmunitarias debilitantes.

Varios principios de la teoría de selección clonal pueden ilustrarse con una breve consideración del tema de la vacunación.

Vacunación

Edward Jenner practicó la medicina en la campiña inglesa en una época en que la viruela era una de las enfermedades más frecuentes y temidas. Con los años, notó que las mujeres que atendían a las vacas no sufrían los embates de la enfermedad. Jenner concluyó que, de alguna manera, las lecheras eran "inmunes" a la viruela porque se infectaban a una edad temprana con vacuna, una enfermedad inocua que contraían de las vacas. La vacuna produce vesículas que se parecen a las vesículas llenas de pus de la viruela, pero las vesículas de la vacuna eran localizadas y desaparecían sin causar nada más que una cicatriz en el sitio de la infección.

En 1796, Jenner realizó uno de los experimentos médicos más famosos (y riesgosos) de todos los tiempos. Primero, infectó a un niño de ocho años de edad con vacuna y le dio tiempo para recuperarse. Seis semanas más tarde, Jenner infectó de manera intencional al niño con viruela mediante la inyección de pus proveniente de una lesión variolosa justo bajo la piel del niño. El niño no mostró signos de la letal enfermedad. En unos cuantos años, miles de personas se habían vuelto inmunes a la viruela mediante la infección intencional con vacuna. Este procedimiento se llamó *vacunación*, por el término latino *vacca.*

El experimento de Jenner tuvo éxito porque la reacción inmunitaria generada contra el virus de la vacuna es efectiva contra el virus muy similar que produce la viruela. La mayoría de las vacunas modernas contienen patógenos *atenuados*, que son capaces de estimular la inmunidad, pero que se "incapacitaron" por medios genéticos para producir la enfermedad. La vacunación contra la viruela de Jenner produce inmunidad mediante la estimulación de las células T, que es el tema de la sección siguiente. En la actualidad, la mayoría de las vacunas son de células B, como la empleada para combatir el tétanos. Este trastorno se debe a la infección con la bacteria anaerobia de la tierra *Clostridium tetani*, que puede entrar al cuerpo mediante una herida punzante. Mientras crecen, las bacterias producen una neurotoxina potente que bloquea la transmisión por las sinapsis inhibidoras de las neuronas motoras, lo que induce una contracción muscular sostenida y asfixia. A los dos meses de edad, casi todos los lactantes están *inmunizados* contra el tétanos gracias a la inoculación con una versión modificada e inocua de la toxina del tétanos (llamada *toxoide*). El toxoide tetánico se une a la superficie de las células B, cuyas moléculas de anticuerpo unidas a la membrana tienen un sitio de unión complementario. Estas células B proliferan para formar un clon de células que produce anticuerpos capaces de unirse con la toxina tetánica real. Tal respuesta inicial se desvanece pronto, pero la persona conserva las células de memoria que responden con rapidez en caso que la persona adquiriera una infección por *C. tetani* más adelante. A diferencia de la mayoría de las inmunizaciones, la inmuni-

dad contra la toxina tetánica no dura toda la vida y ésa es la razón por la que las personas reciben refuerzos cada 10 años. El refuerzo contiene la proteína toxoide y estimula la producción de más células de memoria. ¿Qué sucede si la persona sufre una herida con potencial de ocasionar tétanos y no puede recordar si alguna vez le aplicaron un refuerzo? En estos casos, es probable que la persona reciba una *inmunización pasiva*, que consiste en anticuerpos que pueden unirse con la toxina tetánica. La inmunización pasiva sólo es efectiva durante un periodo corto y no protege al receptor contra una infección posterior.

REVISIÓN ?

1. Compare y analice los mecanismos instructivo y selectivo de la producción de anticuerpos.
2. ¿Cuáles son los principios básicos de la teoría de selección clonal?
3. ¿Qué significa que una célula B se comprometa con la formación de anticuerpos?, ¿cómo influye la presencia de un antígeno en este proceso?, ¿qué papel tiene un antígeno en la producción de anticuerpos?
4. ¿Qué significan los términos "memoria inmunológica" y "tolerancia inmunológica"?

17.3 LINFOCITOS T: ACTIVACIÓN Y MECANISMO DE ACCIÓN

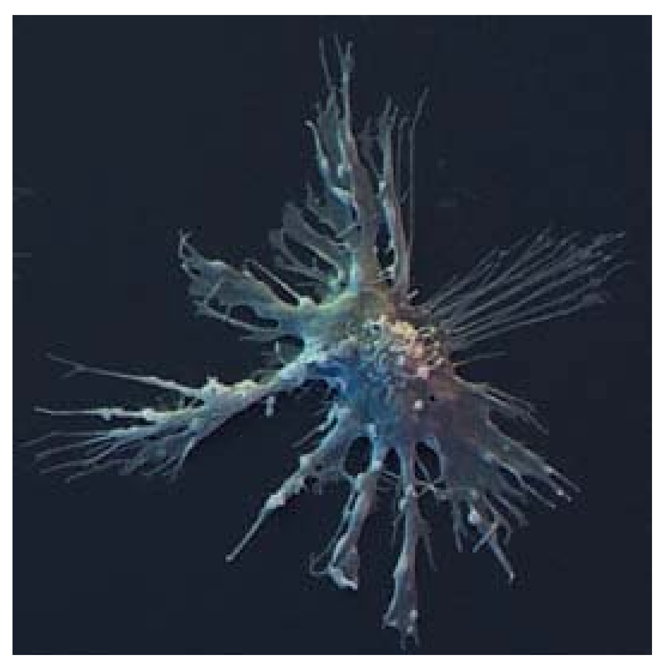
Al igual que las células B, las células T están sujetas a un proceso de selección clonal. Las células T poseen una proteína superficial llamada **receptor de célula T**, que les permite interactuar de manera específica con un antígeno particular. Al igual que las moléculas de anticuerpo que sirven como receptores en las células B, las proteínas que actúan como receptores de la célula T conforman una gran población de moléculas con sitios de combinación de diferentes formas. Del mismo modo que la célula B produce sólo una especie de anticuerpo, cada célula T tiene sólo una especie de receptor de célula T. Se estima que los adultos humanos alojan cerca de 10^{12} células T que en conjunto presentan más de 10^7 receptores diferentes para antígenos.

Sin embargo, con las células B que se activan por antígenos intactos y solubles, las células T se activan por fragmentos de antígenos que se presentan en la superficie de otras células llamadas **células presentadoras de antígeno** (**APC**). Considérese lo que sucedería si una célula hepática o renal se infectara con un virus. La célula infectada presentaría porciones de las proteínas víricas en su superficie (véase fig. 17-22), lo que permitiría a la célula infectada unirse con una célula T con el receptor de célula T apropiado. Como resultado de esta presentación, el sistema inmunitario se alerta ante la entrada de un patógeno específico. El proceso de presentación de antígeno se explica con detalle en el capítulo (pág. 713) y también es el tema de la sección Vías experimentales.

Aunque cualquier célula infectada puede servir como una APC para activar a las células T, ciertos tipos de APC "profesionales" se especializan en esta función. Las APC profesionales incluyen células dendríticas y macrófagos (fig. 17-9). La descripción se enfoca en las células dendríticas (DC), que a menudo se describen como los "centinelas" del sistema inmunitario. Las células dendríticas obtuvieron este título porque "montan guardia" en los tejidos periféricos del cuerpo, donde es probable que entren los patógenos (como la piel y las vías respiratorias). Las células dendríticas son muy propensas a iniciar una reacción inmunitaria adaptativa.

Cuando se encuentran en los tejidos periféricos del cuerpo, las DC inmaduras reconocen e interiorizan microbios y otros materiales ajenos mediante fagocitosis. Una vez que la célula dendrítica capta al microbio, debe procesarse antes de poder

(*a*)



(*b*)

FIGURA 17-9 Células presentadoras de antígeno profesionales (APC). Micrografías electrónicas de barrido coloreadas de un macrófago (*a*) y una célula dendrítica (*b*). Las células dendríticas tienen forma irregular, con largos procesos citoplásmicos que se parecen a las dendritas de una neurona y de ahí su nombre. (*A*, TOMADA DE A. POLLIACK/PHOTO RESEARCHERS, INC. *B*, TOMADA DE DAVID SCHARF/PETER ARNOLD, INC.)

presentar sus componentes a otra célula. Para el procesamiento de antígenos es necesario que el material ingerido se fragmente por vía enzimática en el citoplasma y los fragmentos se muevan a la superficie celular (véase fig. 17-21). Las DC con el antígeno migran a los ganglios linfáticos cercanos, donde se diferencian en células presentadoras de antígeno maduras. Una vez en un ganglio linfático, las DC entran en contacto con una gran reserva de células T, incluido un porcentaje diminuto cuyos receptores de célula T pueden unirse de manera específica con el antígeno ajeno procesado, lo cual activa a la célula T. Tras activarse, la célula T prolifera para formar un clon de células T con el mismo receptor de célula T. Se estima que una sola célula T activada puede dividirse tres a cuatro veces al día durante varios días, lo que genera una enorme población de células T capaces de interactuar con el antígeno extraño. La proliferación masiva de linfocitos T específicos como respuesta a una infección se refleja muchas veces en el crecimiento de los ganglios linfáticos locales. Una vez que se elimina el antígeno extraño, la gran mayoría de la población extendida de células T muere por apoptosis y deja una población relativamente pequeña de células T de memoria, capaces de responder con rapidez en caso de un contacto futuro con el mismo patógeno.

A diferencia de las células B que secretan anticuerpos, las células T realizan su función mediante interacciones directas con otras células, incluidas las células B, otras células T o células blanco localizadas en todo el cuerpo. Esta interacción entre células puede conducir a la activación, desactivación o muerte de la otra célula. Además del contacto directo, muchas interacciones de las células T tienen la mediación de mensajeros químicos muy activos llamados **citocinas**, que actúan en concentraciones muy bajas. Las citocinas son pequeñas proteínas producidas por una gran variedad de células e incluyen interferones (IFN), interleucinas (IL) y factores de necrosis tumoral (TNF). Las citocinas se unen con receptores específicos en la superficie de una célula que responde, lo que genera una señal interna que altera la actividad de la célula. Como respuesta a una citocina, es posible que una célula se prepare para dividirse, se diferencie o secrete sus propias citocinas. Una familia de pequeñas citocinas denominadas *quimiocinas*, actúa sobre todo como quimioatrayentes que estimulan la migración de linfocitos al tejido inflamado. Los distintos tipos de linfocitos y fagocitos tienen receptores para distintas quimiocinas, de manera que sus patrones de migración pueden controlarse por separado. El cuadro 17-1 presenta una lista de algunas de las citocinas mejor estudiadas.

En las células T pueden distinguirse dos subclases principales según sean las proteínas de su superficie y sus funciones biológicas.

1. ***Linfocitos T citotóxicos* (CTL)**, que revisan a las células del cuerpo para reconocer anormalidades. En circunstancias comunes, las células sanas no sufren daño por los CTL, pero las células viejas o infectadas, y tal vez las células malignas, son atacadas y destruidas. Los CTL aniquilan células blanco porque las inducen hacia la apoptosis. Se han descubierto dos vías distintas para destruir células. En una, el CTL libera perforinas y granzimas al espacio entre las células. Las *perforinas* son proteínas que se ensamblan dentro de la membrana de la célula blanco para formar canales transmembranosos. Las *granzimas* son enzimas proteolíticas que entran por los canales de perforina y activan a las caspasas, que son las enzimas proteolíticas que inician la respuesta de apoptosis (pág. 654). En la otra vía, el CTL se une con un receptor en la superficie de la célula blanco, lo que activa una vía de suicidio en la célula blanco similar a la de la figura 15-35. Al destruir a las células infectadas, los CTL eliminan virus, bacterias, levaduras, protozoarios y parásitos después que ingresaron a las células hospedadoras y ya no son accesibles a los anticuerpos circulantes. Los CTL tienen una proteína superficial llamada CD8 (designación de cúmulo 8) y se conocen como células $CD8^+$.
2. ***Los linfocitos T colaboradores*** (células T_H) activan otras células T. Se distinguen de los CTL por la presencia de la proteína CD4 en su superficie, en lugar de la CD8.[2] Las células T_H se activan por efecto de células presentadoras de antígeno profesionales, como las células dendríticas y los macrófagos (fig. 17-10). Este es uno de los primeros y más importantes pasos para iniciar una reacción inmunitaria adaptativa. Una vez activadas, las células T_H regulan las respuestas inmunitarias siguientes mediante el reconocimiento y activación de otros linfocitos que son específicos para el mismo antígeno. Casi todas las células B requieren la ayuda de las células T_H antes de poder madurar y diferenciarse en células plasmáticas productoras de anticuerpos. Las células B se activan por la interacción directa con una célula T_H, como se muestra en la figura 17-10 (y con más detalle en la figura 17-25). Por

Cuadro 17-1 Algunas citocinas

Citocina	Fuente	Funciones principales
IL-1	Diversas	Induce inflamación, estimula la proliferación de células T_H
IL-2	Células T_H	Estimula la proliferación de células T y células B
IL-4	Células T	Induce cambio de clase de IgM a IgG en las células B, suprime la acción inflamatoria de citocinas
IL-5	Células T_H	Estimula la diferenciación de células B
IL-10	Células T, macrófagos	Inhibe la función de macrófagos, suprime la acción inflamatoria de citocinas
IFN-γ	Células T_H, CTL	Induce la expresión de MHC en las APC, activa células NK
TNF-α	Diversas	Induce inflamación, activa la producción de óxido nítrico en los macrófagos
GM-CSF	Células T_H, CTL	Estimula el crecimiento y proliferación de granulocitos y macrófagos

[2] Hay dos clases principales de células T colaboradoras, T_H1 y T_H2, que pueden distinguirse por las citocinas que secretan y su función básica. Las células T_H1 producen IFN-γ y protegen al cuerpo mediante la activación de macrófagos para destruir bacterias intracelulares que pudieran alojar (pág. 318). Las células T_H2 producen IL-4 y protegen contra patógenos extracelulares mediante la activación de las células B para que produzcan anticuerpos. Los dos tipos de células T_H se diferencian a partir de un precursor común después de la estimulación por distintas citocinas.

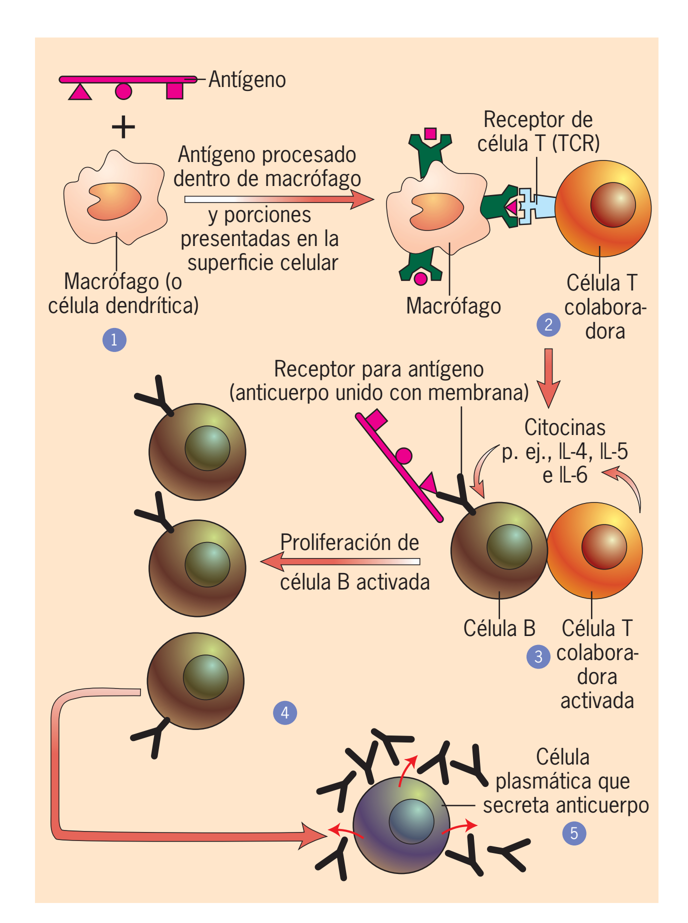


FIGURA 17-10 Esquema muy simplificado que muestra el papel de las células T_H en la formación de anticuerpos. En el paso 1, el macrófago interactúa con el antígeno complejo. El antígeno se lleva al interior del macrófago y se divide en fragmentos, los cuales se presentan en la superficie celular. En el paso 2, el macrófago interactúa con una célula T_H cuyo TCR se une con uno de los fragmentos del antígeno presentados (la proteína de membrana verde es una molécula MHC, pág. 710). Esta interacción activa a la célula T. En el paso 3, la célula T_H activada interactúa con una célula B, cuyo receptor para antígeno está unido con un antígeno soluble intacto. La activación de la célula B se estimula por citocinas (p. ej., IL-4, IL-5 e IL-6) liberadas por la célula T_H hacia el espacio que la separa de la célula B adyacente. La interacción con la célula T_H activa a la célula B, lo que induce la proliferación de esta última (paso 4). La progenie de la célula B activada se diferencia en células plasmáticas que sintetizan anticuerpos que pueden unirse con el antígeno (paso 5).

lo tanto, la formación de anticuerpos requiere la activación de células B y T capaces de interactuar de manera específica con el mismo antígeno. La importancia de las células T_H se torna evidente cuando se consideran los efectos devastadores que tiene el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el causante del sida. Las células T_H son los principales blancos del VIH. La mayoría de las personas infectadas por este virus permanece libre de síntomas mientras su cuenta de células T_H mantenga niveles relativamente altos, por arriba de 500 células/μl (la cuenta normal es mayor de 1 000 células/μl). Una vez que la cifra cae por debajo de unas 200 células/μl, la persona desarrolla el sida completo y se vuelve susceptible al ataque de patógenos víricos y celulares.

3. Los ***linfocitos T reguladores*** (células T_{Reg}) son principalmente células inhibidoras que suprimen las actividades de otras células inmunitarias. Se caracterizan por poseer marcadores de superficie $CD4^+CD25^+$, y se piensa que tienen un cometido importante para limitar la inflamación y mantener la autotolerancia inmunitaria. Las células T_{Reg} realizan esta última actividad impidiendo que linfocitos T que portan receptores autorreactivos ataquen las células del propio organismo. Por otro lado, estas mismas células pueden ser dañinas para la salud al impedir que el sistema inmunitario libre al cuerpo de células tumorales. Una enfermedad humana letal (IPEX), que se caracteriza por autoinmunidad grave en recién nacidos, se debe a la mutación de un gen (*FOXP3*) que es necesario para la diferenciación de las células T_{Reg}. Los estudios con células T_{Reg} han aportado la demostración directa de que la homeostasis del sistema inmunitario requiere de un estrecho equilibrio entre influencias estimuladoras e inhibidoras.

REVISIÓN ?

1. ¿De qué modo una célula infectada revela su condición a una célula T?, ¿cuál es la respuesta de la célula T?
2. ¿Qué es una célula presentadora de antígeno?, ¿qué tipos de células pueden actuar como presentadoras de antígeno?
3. Mencione las similitudes y diferencias entre las propiedades y funciones de la célula T_H y el linfocito T citotóxico, y de las células T_H y T_{Reg}.

17.4 ALGUNOS TEMAS SOBRE LAS BASES CELULARES Y MOLECULARES DE LA INMUNIDAD

La estructura molecular de los anticuerpos

Los anticuerpos son proteínas producidas por las células B y sus descendientes (células plasmáticas). Las células B incorporan moléculas de anticuerpo en su membrana plasmática, donde sirven como receptores de antígenos, mientras que las células plasmáticas secretan estas proteínas a la sangre u otros líquidos corporales, donde sirven como un arsenal molecular en la guerra del cuerpo contra los patógenos invasores. La interacción entre los anticuerpos sanguíneos y los antígenos en la superficie de un virus o célula bacteriana puede neutralizar la capacidad del patógeno para infectar una célula hospedadora y facilitar la ingestión y destrucción del patógeno por parte de los fagocitos móviles. El sistema inmunitario produce millones de distintas moléculas de anticuerpos que, en conjunto, pueden unirse con cualquier sustancia ajena a la que se exponga el cuerpo. Aunque el sistema inmunitario muestra una gran diversidad mediante los anticuerpos que produce, una sola molécula de anticuerpo puede interactuar con sólo una o unas cuantas estructuras antigénicas relacionadas.

Los anticuerpos son proteínas globulares llamadas *inmunoglobulinas*. Las inmunoglobulinas se forman con dos tipos de cadenas polipeptídicas, las **cadenas pesadas** más grandes (masa

Cuadro 17-2 Clases de inmunoglobulinas humanas

Clase	Cadena pesada	Cadena ligera	Masa molecular (kDa)	Propiedades
IgA	α	κ o λ	360-720	Presente en lágrimas, moco nasal, leche materna, secreciones intestinales
IgD	δ	κ o λ	160	Presente en membranas plasmáticas de células B, función desconocida
IgE	ϵ	κ o λ	190	Se une con mastocitos, libera la histamina que causa las reacciones alérgicas
IgG	γ	κ o λ	150	Principales anticuerpos solubles sanguíneos; cruza la placenta
IgM	μ	κ o λ	950	Presente en las membranas plasmáticas de las células B; media la reacción inmunitaria inicial; activa complemento destructor de bacterias

molecular de 50 000 a 70 000 daltones) y las **cadenas ligeras** más pequeñas (masa molecular de 23 000 daltones). Los dos tipos de cadenas se unen entre sí en pares mediante enlaces disulfuro. Se han identificado cinco clases distintas de inmunoglobulinas (*IgA*, *IgD*, *IgE*, *IgG* e *IgM*). Las diferentes inmunoglobulinas aparecen en momentos diversos después de la exposición a una sustancia extraña y tienen distintas funciones biológicas (cuadro 17-2). Las moléculas de IgM son los primeros anticuerpos que secretan las células B después de la estimulación por un antígeno y aparecen en la sangre luego de un retraso de unos cuantos días (fig. 17-11). Las moléculas de IgM poseen una vida media relativamente corta (unos cinco días) y su aparición va seguida de la secreción de moléculas de IgG e IgE con vida más prolongada. Las moléculas de IgG son los anticuerpos que predominan en la sangre y la linfa durante una respuesta secundaria a la mayoría de los antígenos (fig. 17-11). Las moléculas de IgE se producen en grandes cantidades como respuesta a muchas infecciones parasitarias. Las moléculas de IgE también tienen gran afinidad por la superficie de los mastocitos, lo que desencadena la liberación de histamina, la cual produce inflamación y síntomas de alergia. La IgA es el anticuerpo predominante en las vías respiratorias, digestivas y urogenitales. La función de IgD aún no se conoce.

Existen dos tipos de cadenas ligeras, las cadenas kappa (κ) y las lambda (λ), ambas presentes en las inmunoglobulinas de las cinco clases. En cambio, cada clase de inmunoglobulina tiene una cadena pesada única que define a la clase (cuadro 17-2).[3] La descripción se enfoca sobre todo en la estructura de las IgG. Una molécula de IgG está formada por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas idénticas dispuestas en una molécula con forma de Y, como se muestra en la figura 17-12*a* y se describe a continuación.

Para conocer la base de la especificidad de los anticuerpos, primero fue necesario identificar la secuencia de aminoácidos de varios anticuerpos específicos. En condiciones normales, el primer paso de la identificación de la secuencia de aminoácidos consiste en purificar la proteína particular a estudiar. Sin embargo, en condiciones normales es imposible obtener una preparación purificada de un anticuerpo específico de la sangre porque cada persona produce una gran cantidad de moléculas de anticuerpos distintos con estructuras demasiado similares para separarse unas de otras. El problema se resolvió cuando se descubrió que la sangre de pacientes que sufren un tipo de cáncer linfoide llamado mieloma múltiple contenía elevadas cifras de una sola molécula de anticuerpo.

Como se describe en el capítulo 16, el cáncer es una enfermedad monoclonal, esto es, que las células de un tumor provienen de la proliferación de una sola célula anormal. Puesto que, en condiciones *normales*, un linfocito sólo produce una especie única de anticuerpo, un paciente con mieloma múltiple libera grandes cantidades del anticuerpo específico que sintetiza la célula particular que se tornó maligna. Un sujeto genera una especie muy abundante de anticuerpo y otros individuos anticuerpos diferentes. Como resultado, los investigadores pudieron purificar cantidades considerables de varios anticuerpos a partir de muchos pacientes y comparar su secuencia de aminoácidos. Pronto se reveló un patrón importante. Se encontró que la mitad de cada cadena ligera kappa (110 aminoácidos en el extremo amino del polipéptido) era una secuencia de aminoácidos constante en todas las cadenas kappa, mientras que la otra

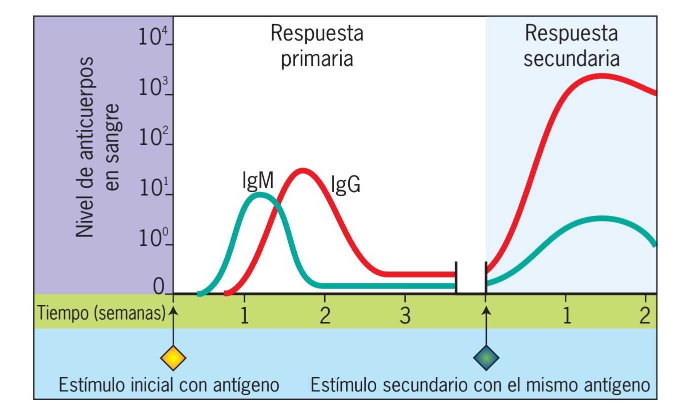


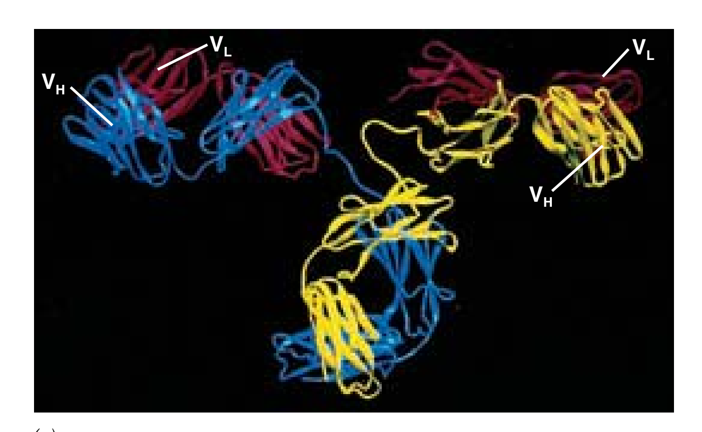
FIGURA 17-11 Respuestas de anticuerpos primaria y secundaria. Una respuesta primaria, que se induce por la exposición inicial al antígeno, conduce primero a la producción de moléculas de anticuerpo IgM solubles, seguida de la producción de moléculas de anticuerpo IgG solubles. La aparición de anticuerpos en la sangre tiene un retraso de varios días. Cuando el antígeno se introduce de nueva cuenta más adelante, se inicia una respuesta secundaria. En comparación con la reacción primaria, la secundaria comienza con la producción de moléculas de IgG (además de IgM), alcanza un nivel sanguíneo de anticuerpos mucho más alto y ocurre casi sin demora.

[3] En realidad, los seres humanos producen cuatro cadenas pesadas relacionadas como parte de sus moléculas de IgG (forman IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) y dos cadenas pesadas relacionadas como parte de sus moléculas de IgA (forman IgA1 e IgA2) (véase fig. 17-17). Estas diferencias no se mencionan en la explicación siguiente.

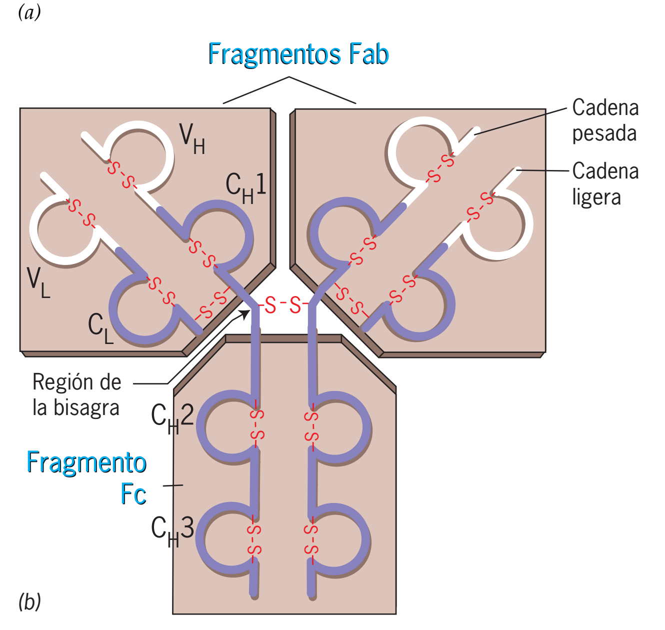
mitad variaba de un paciente a otro. Una comparación similar de secuencias de aminoácidos de muchas cadenas lambda de distintos pacientes reveló que también tienen una sección con secuencia constante y otra cuya secuencia varía de una inmunoglobulina a otra. Las cadenas pesadas de la IgG purificada también poseen una porción variable (V) y otra constante (C). La figura 17-12*b* presenta un esquema de la estructura de estas moléculas de IgG.

Se observó además que, mientras que cerca de la mitad de cada cadena ligera consiste en una región variable (V_L), sólo un cuarto de cada cadena pesada es variable (V_H) entre los distintos pacientes; los tres cuartos restantes de la cadena pesada (C_H) son constantes en todas las IgG. La porción constante de la cadena pesada puede dividirse en tres secciones de longitud similar que son homólogas entre sí. Estas unidades homólogas de Ig se designan C_H1, C_H2 y C_H3 en la figura 17-12*b*. Al parecer, las tres secciones de la parte C de la cadena pesada de la IgG (así como las de las cadenas pesadas de las otras clases de Ig y las porciones C de las cadenas ligera kappa y lambda) surgieron durante la evolución por duplicación de un gen ancestral que codificaba una unidad de Ig de unos 110 aminoácidos. También se cree que las regiones variables (V_H o V_L) surgieron durante la evolución a partir de la misma unidad de Ig ancestral. El análisis estructural indica que cada una de las unidades Ig homólogas de una cadena pesada o una ligera se pliega de manera independiente para formar un dominio compacto que se mantiene unido mediante un enlace disulfuro (fig. 17-13). En una molécula intacta de IgG, cada dominio de la cadena ligera se relaciona con un dominio de la cadena pesada como se muestra en la figura 17-12*a*, *b*. El análisis genético indica que cada dominio se codifica en su propio exón.

La especificidad de un anticuerpo depende de los aminoácidos de los sitios que se combinan con el antígeno en los extremos de cada brazo de la molécula de anticuerpo con forma de Y (fig. 17-12). Los dos sitios de combinación de una sola molécula de IgG son idénticos y cada uno se forma por la relación de la porción variable de una cadena ligera con la sección variable de una cadena pesada (fig. 17-12). El ensamble de anticuerpos con distintas combinaciones de cadenas ligeras y pesadas permite que una persona produzca una notoria variedad de anticuerpos a



(a)



(b)

FIGURA 17-12 Estructura de un anticuerpo. *a*) Modelo de una molécula de IgG. La molécula contiene cuatro cadenas de polipéptido: dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Una de las cadenas pesadas se muestra en azul, la otra en amarillo, mientras que ambas cadenas ligeras se presentan en rojo. Los dominios de cada cadena (dos por cada cadena ligera y cuatro por cada pesada) son evidentes. *b*) Modelo esquemático que muestra la estructura del dominio de una molécula de IgG. La estructura terciaria de cada dominio de Ig se mantiene por un enlace disulfuro. Los dominios que comprenden una región constante de la cadena polipeptídica se indican con la letra C; los dominios que tienen una región variable se señalan con la letra V. Cada cadena pesada contiene tres regiones C_H (C_H1, C_H2, C_H3) y una región V_H en el extremo N del polipéptido. Cada cadena ligera posee una región C_L y una V_L en su extremo N. Las regiones variables de cada cadena ligera y pesada forman un sitio para combinación con antígeno. Cada molécula de IgG con forma de Y contiene dos sitios para combinación con antígeno. Cada molécula de IgG puede fragmentarse con un tratamiento proteolítico ligero en dos fragmentos Fab que contienen sitios para combinación con antígeno y un fragmento Fc, como se indica. (*A*, POR CORTESÍA DE ALEXANDER MCPHERSON.)

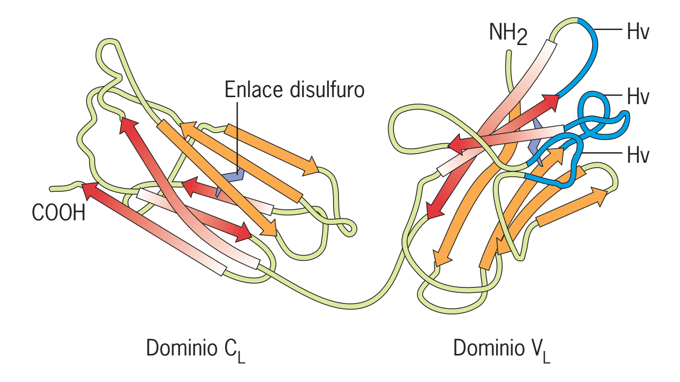


FIGURA 17-13 Dominios de anticuerpos. Dibujo esquemático de una cadena ligera lambda sintetizada por células de un paciente con mieloma múltiple. El polipéptido se pliega para que las porciones constantes y variables se presenten en dominios separados. Las flechas gruesas representan cadenas beta, que se ensamblan en hojas beta. Cada dominio tiene dos hojas beta, las cuales se distinguen por los colores rojo y naranja. Los tres segmentos hipervariables (Hv) de la cadena se presentan como asas en un extremo del dominio variable, que forma parte del sitio para combinación con antígeno del anticuerpo. (TOMADA DE M. SCHIFFER ET AL., BIOCHEMISTRY 12:4628, 1973; © 1973, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY.)

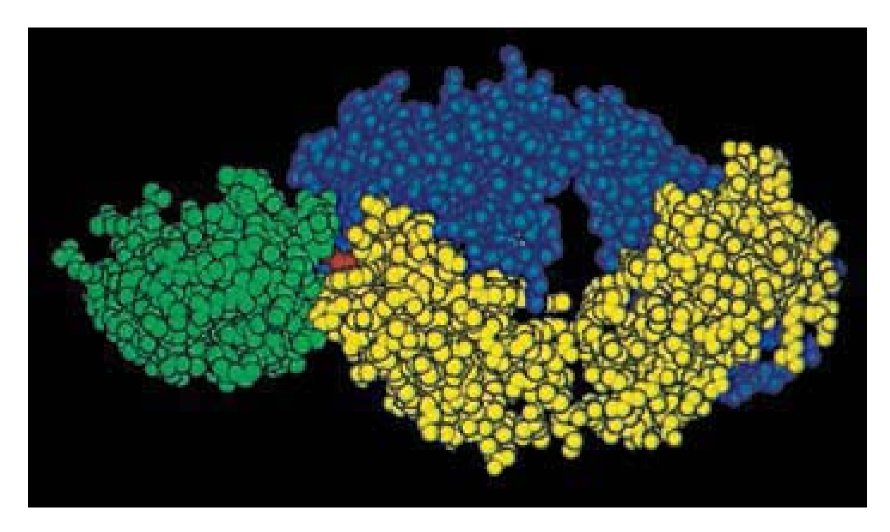


FIGURA 17-14 Interacción antígeno-anticuerpo. Modelo espacial basado en la cristalografía con rayos X de un complejo entre lisozima (verde) y la porción Fab de una molécula de anticuerpo (véase fig. 17-12). La cadena pesada del anticuerpo es azul; la cadena ligera es amarilla. Un residuo de glutamina de la lisozima está en rojo. (Reimpresa con autorización de A. G. Amit, R. A. Mariuzza, S. E. V. Phillips y R. J. Poljak, Science 233:749, 1986; © 1986, American Association for the Advancement of Science.)

partir de una cantidad modesta de polipéptidos diferentes (pág. 708).

Una mirada más cercana a los polipéptidos de las inmunoglobulinas revela que las porciones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen subregiones que son muy variables, o *hipervariables*, de un anticuerpo a otro (marcadas como Hv en la figura 17-13). Las cadenas ligeras y pesadas contienen los segmentos hipervariables que se aglomeran en los extremos de cada brazo de la molécula de anticuerpo. Como pudiera esperarse, las regiones hipervariables tienen un papel importante en la formación de la estructura del sitio para combinación con antígeno, el cual varía desde una hendidura profunda hasta una hendidura angosta o un saco relativamente plano. Las variaciones de la secuencia de aminoácidos de las regiones hipervariables explican la gran diversidad de la especificidad de los anticuerpos, lo que permite a estas moléculas unirse con antígenos de todas las formas concebibles.

El sitio de combinación de un anticuerpo tiene una estructura estereoquímica complementaria con una porción particular del antígeno, llamado **epitopo** (o *determinante antigénico*). A causa de su ajuste preciso, los anticuerpos y los antígenos forman complejos estables, aunque se unen sólo mediante fuerzas covalentes que son muy débiles si se los considera en forma individual. La figura 17-14 muestra la interacción exacta entre un antígeno particular y un anticuerpo demostrada por cristalografía con rayos X. Las dos regiones de bisagra dentro de la molécula (fig. 17-12) proporcionan la flexibilidad necesaria para que el anticuerpo se una con dos moléculas de antígeno separadas o con una sola molécula con dos epitopos idénticos.

En tanto que las porciones hipervariables de las cadenas ligeras y pesadas determinan la especificidad del sitio de combinación de un anticuerpo, las porciones restantes de los dominios variables suministran un andamiaje que mantiene la estructura general del sitio de combinación. Las porciones constantes de las moléculas de anticuerpo también son relevantes. Las diferentes clases de anticuerpos (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) tienen cadenas pesadas distintas cuyas regiones constantes difieren en notable proporción en longitud y secuencia. Estas diferencias permiten a los anticuerpos de varias clases realizar distintas funciones biológicas (efectoras). Por ejemplo, las cadenas pesadas de una molécula de IgM se unen y activan a una de las proteínas del sistema del complemento, lo cual conduce a la lisis de las células bacterianas con las que se unen las moléculas de IgM. Las cadenas pesadas de las moléculas IgE tienen un papel importante en las reacciones alérgicas porque se unen con receptores específicos en las superficies de los mastocitos, lo que inicia la liberación de histamina. En cambio, las cadenas pesadas de una molécula de IgG se unen de manera específica con los receptores de superficie de los macrófagos y neutrófilos, lo que induce a estas células fagocíticas a ingerir la partícula a la cual están unidos los anticuerpos. Las cadenas pesadas de las moléculas de IgG también son importantes para permitir que esta clase de anticuerpo pase de los vasos sanguíneos de una madre a los de su feto durante el embarazo. Aunque esto proporciona al feto y al recién nacido inmunidad pasiva contra organismos infecciosos, también puede precipitar un trastorno que pone en riesgo la vida y se llama eritroblastosis fetal. Para que ocurra este trastorno, una madre Rh^- debe haber dado a luz a un hijo con fenotipo Rh^+ (genotipo Rh^+/Rh^-) en un embarazo previo. Por lo general, la madre se expone al antígeno fetal Rh^+ durante el parto del primer hijo, el cual no se afecta. Sin embargo, si la madre tuviera un segundo embarazo Rh^+, los anticuerpos presentes en su corriente sanguínea pueden entrar a la circulación fetal y destruir los eritrocitos del feto. Los lactantes que nacen con este problema se someten a transfusión sanguínea, lo cual elimina los anticuerpos maternos de la sangre.

Reajuste de DNA de los genes que codifican los receptores de antígeno de las células B y T

Como ya se explicó, cada molécula de IgG está formada por dos cadenas ligeras (L) y dos pesadas (H). Ambos tipos de polipéptidos consisten en dos partes reconocibles, una porción variable (V) cuya secuencia de aminoácidos difiere de una especie de anticuerpo a otra, y una porción constante (C), cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en todas las cadenas H o L de la misma clase. ¿Cuál es la base genética para la síntesis de polipéptidos con una combinación de secuencias de aminoácidos compartidas y únicas?

En 1965, William Dreyer del *California Institute of Technology* y J. Claude Bennett de la *Alabama University* pre-

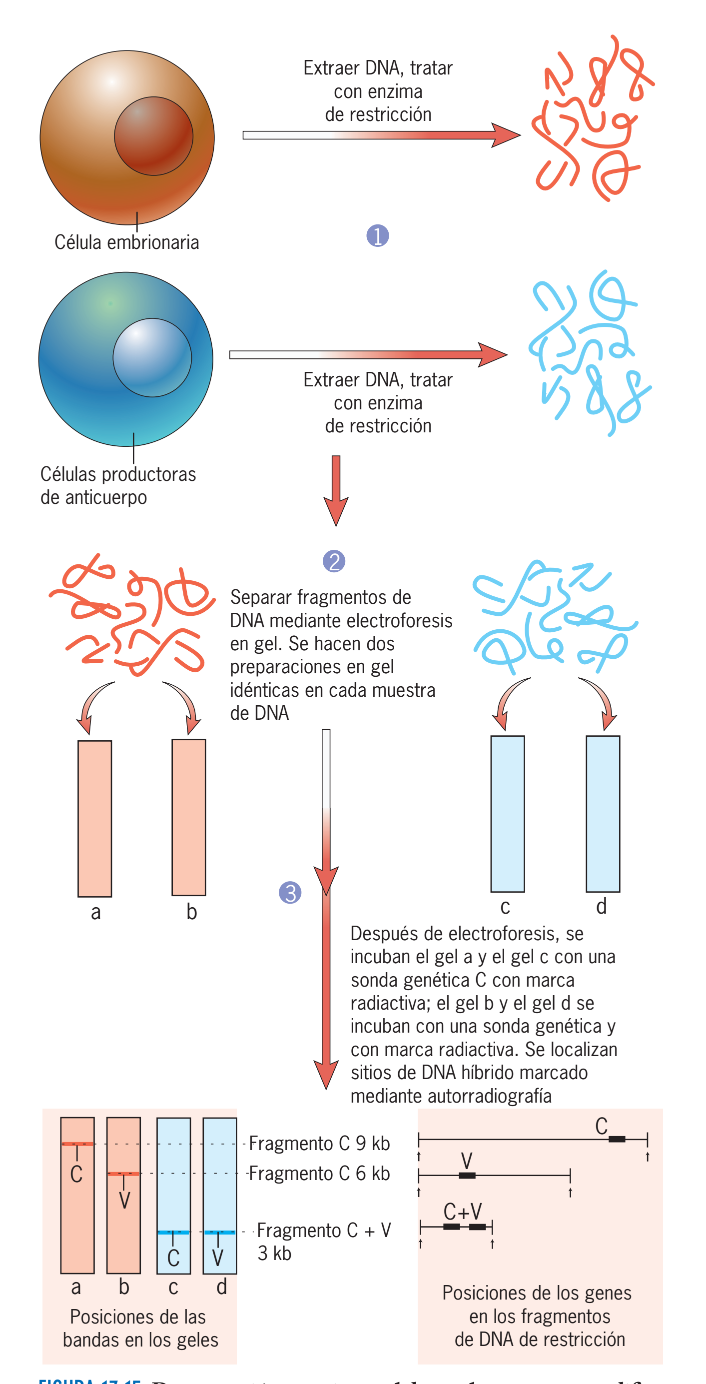


FIGURA 17-15 Demostración experimental de que los genes que codifican las cadenas ligeras de anticuerpo se forman por recombinación de DNA. Primero, se extrae DNA de células embrionarias o células cancerosas productoras de anticuerpos y se fragmenta con una endonucleasa de restricción (paso 1) que divide ambas cadenas del DNA en una secuencia específica. Los fragmentos de DNA de las dos preparaciones se fraccionan por separado mediante electroforesis en gel; se preparan dos geles idénticos de cada muestra de DNA (paso 2). Después de la electroforesis, cada gel se incuba con una sonda marcada que contiene la secuencia genética variable (V) o constante (C) (paso 3). La localización del DNA marcado unido en el gel se revela por autorradiografía y se muestra en la parte inferior de la figura. En tanto las secuencias genéticas V y C se localizan en fragmentos separados en el DNA de células embrionarias, las dos secuencias se localizan en el mismo fragmento pequeño de DNA en las células productoras de anticuerpo. Las secuencias genéticas V y C se unen durante el desarrollo de las células B por un proceso de recombinación de DNA.

sentaron la hipótesis de "dos genes-un polipéptido" para explicar la estructura del anticuerpo. En esencia, Dreyer y Bennett propusieron que cada cadena de anticuerpo está codificada por dos genes separados, un gen C y otro V, que de alguna manera se combinan para formar un "gen" continuo que codifica una sola cadena ligera o pesada. En 1976, Susumu Tonegawa que trabajaba en un instituto de investigación en Basilea, Suiza, proporcionó evidencia clara en favor de la hipótesis del reajuste del DNA. El esbozo básico del experimento se muestra en la figura 17-15. En este experimento, Tonegawa y sus colegas compararon la longitud del DNA entre las secuencias de nucleótidos que codifican las porciones C y V de una cadena específica de anticuerpo en dos tipos distintos de células de ratón: células embrionarias tempranas y células de mieloma maligno productoras de anticuerpo. Los segmentos de DNA que codificaban las porciones C y V del anticuerpo se separaron en notorio grado en el DNA embrionario, pero se mantuvieron muy cercanas entre sí en el DNA obtenido de las células del mieloma productoras de anticuerpo (fig. 17-15). Estos hallazgos sugirieron que los segmentos de DNA que codifican las partes de las moléculas de anticuerpos se reajustaban durante la formación de las células productoras de anticuerpos.

Investigaciones posteriores revelaron el reajuste preciso de las secuencias de DNA que dan origen a los genes de anticuerpos. Para simplificar la explicación, se consideran sólo las secuencias de DNA que intervienen en la formación de las cadenas ligeras kappa humanas, que se localizan en el cromosoma 2. La organización de las secuencias en el DNA de la línea germinal (esto es, el DNA de un espermatozoide o un óvulo) que participan en la formación de las cadenas ligeras kappa humanas se muestra en la línea superior (paso 1) de la figura 17-16. En este caso, varios genes V_κ diferentes se localizan en una serie lineal y están separados de un solo gen C_κ por cierta distancia. El análisis de secuencia de nucleótidos de estos genes V indicó que son más cortos de lo necesario para codificar la región V de la cadena ligera kappa. La razón quedó clara cuando se identificó la secuencia de otros segmentos de la región. El segmento de nucleótidos que codifica los 13 aminoácidos en el extremo carboxilo de una región V se localiza a cierta distancia del resto de la secuencia del gen V_κ. Esta pequeña porción que codifica el extremo carboxilo de la región V se denomina *segmento J*. Como se muestra en la figura 17-16, hay cinco segmentos J_κ distintos de secuencia de nucleótidos relacionada dispuestos uno después del otro. El cúmulo de segmentos J_κ está separado del gen C_κ por un segmento adicional de más de 2 000 nucleótidos. Como se ilustra en la figura 17-16 (pasos 2 a 3), un gen V_κ completo se forma cuando un gen V_κ específico se une con uno de los segmentos J_κ y se corta el DNA intermedio. Este proceso lo cataliza un complejo proteico llamado *recombinasa V(D)J*. Como se indica en la figura 17-16, la secuencia del gen V_κ generada por este reajuste de DNA aún está separada del gen C_κ por más de 2 000 nucleótidos. No ocurre un nuevo reajuste del DNA en el ensamble del gen kappa antes de la transcripción; toda la región genética se transcribe en una gran transcripción primaria (paso 4) de la cual se cortan los intrones mediante división de RNA (paso 5).

El reajuste comienza cuando se trazan cortes en la cadena doble en el DNA entre un gen V y uno J. Los cortes se catalizan por un par de proteínas llamadas RAG1 y RAG2 que son parte de la recombinasa V(D)J. A continuación, los cuatro extremos libres que se producen se unen de tal forma que los segmentos

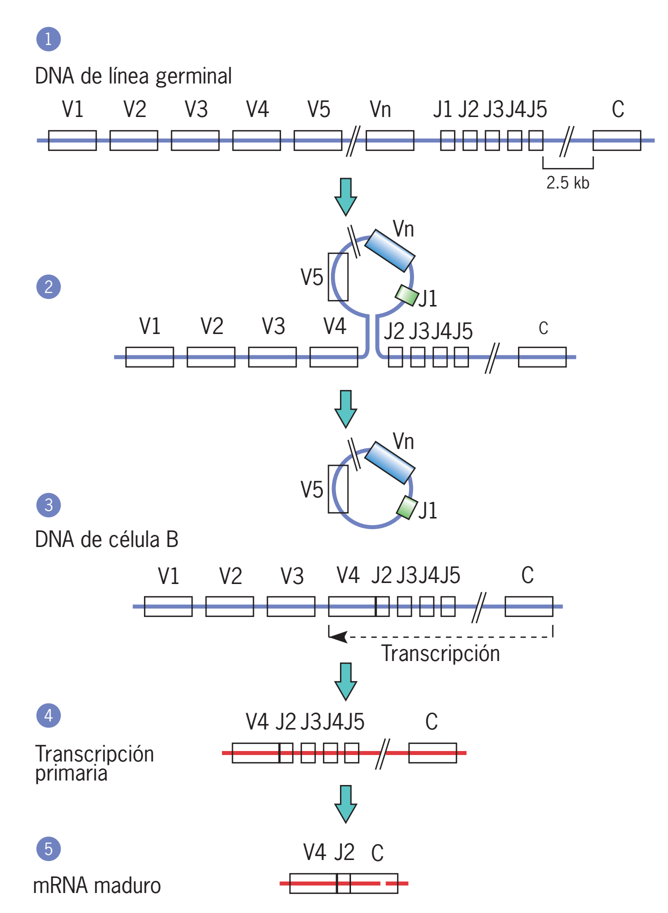


FIGURA 17-16 Recombinaciones de DNA que conducen a la formación de un gen funcional que codifica una cadena kappa de inmunoglobulina. La organización de las secuencias de DNA variable (V), de unión (J) y constante (C) dentro del genoma se muestra en el paso 1. Los pasos que conducen a la síntesis del mRNA maduro que codifica el polipéptido de la cadena kappa se describe en el texto. La unión aleatoria de un segmento V y uno J (pasos 2 y 3) determina la secuencia de aminoácidos del polipéptido. El espacio entre los segmentos J y C "elegidos" (el C puede contener uno o más segmentos J, como se muestra en la figura) permanece como un intrón en el gen. La porción del transcrito primario (paso 4) que corresponde a este intrón se elimina durante el procesamiento del RNA (paso 5).

codificadores V y J se unen para formar un exón que codifica la región variable de la cadena polipeptídica, mientras que los dos extremos del DNA intermedio se unen para crear una pequeña pieza circular de DNA que se desplaza del cromosoma (fig. 17-16, paso 3). La unión de los extremos rotos de DNA se realiza por el mismo proceso básico empleado para reparar las roturas en la cadena de DNA como se mostró en la figura 13-29.

El reajuste de las secuencias de DNA para Ig tiene notables consecuencias para el linfocito. Una vez que la secuencia V_κ específica se une con una secuencia J_κ específica, esa célula no puede sintetizar ninguna otra especie de cadena kappa. Se estima que el DNA de las células germinales humanas contiene cerca de 40 genes V_κ funcionales. Por lo tanto, si se asume que cualquier secuencia V puede unirse con cualquier secuencia J, se espera que una persona pueda sintetizar cerca de 200 cadenas kappa diferentes (cinco segmentos $J_\kappa \times 40$ genes V_κ). Sin embargo, esta no es la única fuente de diversidad entre estos polipéptidos. El sitio en el cual se une una secuencia J con una secuencia V puede variar un poco de un reajuste a otro, de manera que los mismos genes V_κ y J_κ pueden unirse en dos células diferentes para producir cadenas ligeras kappa con distintas secuencias de aminoácidos. Se obtiene aún más variabilidad por la enzima transferasa de desoxinucleotidilo, que inserta nucleótidos en los sitios de rotura de la cadena. Estas fuentes de variabilidad adicional incrementan la diversidad de las cadenas kappa 10 veces más, lo que eleva el número por lo menos a 2 000 especies. El sitio en el que se unen las secuencias V y J es parte de una de las regiones hipervariables de cada polipéptido del anticuerpo (fig. 17-13). Por lo tanto, las diferencias ligeras en un sitio de unión pueden tener efectos considerables en la interacción anticuerpo-antígeno.

La discusión se ha limitado a las cadenas ligeras kappa por razones de sencillez. Se producen tipos similares de reajustes del DNA durante el compromiso de una célula con la síntesis de una cadena ligera lambda particular y una cadena pesada específica. Mientras que las regiones variables de las cadenas ligeras se forman con dos segmentos distintos (segmentos V y J), las regiones variables de las cadenas pesadas se forman con tres segmentos diferentes (segmentos V, D y J) por reajustes similares. El genoma humano contiene 51 segmentos V_H, 25 segmentos D_H y seis segmentos J_H funcionales. Dada la diversidad adicional que deriva de la variabilidad de la unión V_H-D_H y D_H-J_H, una persona puede sintetizar por lo menos 100 000 cadenas pesadas. Los receptores de antígeno de las células T (TCR) también consisten en un tipo de cadena pesada y ligera, cuyas regiones variables se forman por un proceso similar de recombinación del DNA.

La formación de genes de anticuerpos mediante la recombinación de DNA ilustra el potencial del genoma para participar en actividades dinámicas. A causa de este mecanismo de recombinación, unas cuantas secuencias de DNA presentes en la línea germinal pueden dar origen a una diversidad notable de productos génicos. Como se explicó antes, una persona sintetiza cerca de 2 000 especies diferentes de cadenas ligeras kappa y 100 000 especies distintas de cadenas pesadas. Si cualquier cadena ligera kappa puede combinarse con cualquiera pesada, una persona puede producir en teoría más de 200 millones de especies de anticuerpos distintos a partir de unos cuantos cientos de elementos genéticos presentes en la línea germinal.[4]

Ya se describió cómo surge la diversidad de anticuerpos de a) la presencia de múltiples exones V, J y D en el DNA de la línea germinal; b) la variabilidad de la unión V-J y V-D-J, y c) la inserción enzimática de nucleótidos. Un mecanismo adicional para generar la diversidad de anticuerpos, conocida como *hipermutación somática*, ocurre mucho después que se completa la recombinación del DNA. Cuando se reintroduce un antígeno específico en un animal después de cierto periodo, los anticuerpos producidos durante la respuesta secundaria tienen mucha mayor afinidad por el antígeno que los producidos durante la respuesta primaria. El aumento de afinidad se debe a pequeños cambios en la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo. Estos cambios en la secuencia se deben a mutaciones en los genes que codifican estos polipéptidos. Se estima que los elementos recombinados

[4] También puede generarse una cantidad más o menos comparable de anticuerpos que contienen cadenas ligeras lambda.

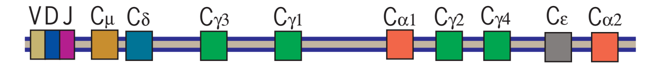


FIGURA 17-17 Disposición de los genes C para las diversas cadenas pesadas humanas. En las personas, las cadenas pesadas de IgM, IgD e IgE se codifican en un solo gen, mientras que las de IgG lo hacen en cuatro genes diferentes y las de IgA en dos genes distintos (véase nota a pie de página 704).

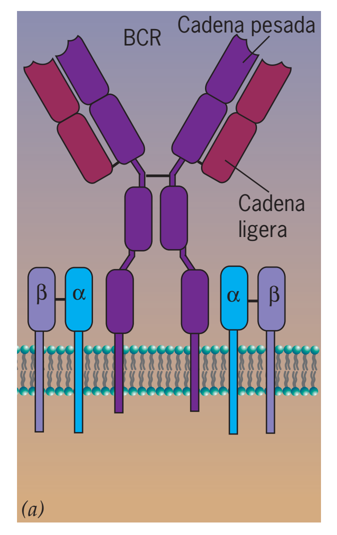
del DNA que codifican las regiones V de los anticuerpos tienen un índice de mutación 10^5 veces mayor que el de otros loci genéticos en la misma célula. El mecanismo que produce esta frecuencia tan alta de mutación en la región V ha sido el centro de varios estudios interesantes en los últimos años. Este mecanismo incluye: a) una enzima, la desaminasa de citosina (AID), que convierte los residuos de citosina del DNA en residuos de uracilo, y b) una o más polimerasas de DNA translesión (pág. 567) que tienden a cometer errores cuando se copia o repara el DNA que contiene uracilos. Las personas que portan mutaciones en la AID y son incapaces de generar hipermutación somática se ven agobiadas por las infecciones y a menudo mueren a edad temprana.

Las células B cuyos genes producen moléculas de Ig con mayor afinidad antigénica se seleccionan de manera preferencial después de una nueva exposición al antígeno. Algunas células proliferan para formar clones que se someten a rondas adicionales de mutación somática y selección, mientras que las células no seleccionadas que expresan inmunoglobulinas de baja afinidad sufren apoptosis. De esta manera, la respuesta de anticuerpos a las infecciones recurrentes o crónicas mejora mucho con el tiempo.

Una vez que una célula se compromete a formar un anticuerpo específico, puede cambiar la clase de Ig que produce (p. ej., de IgM a IgG) mediante el cambio de la cadena pesada producida en la célula. Este proceso, conocido como *cambio de clase*, ocurre sin modificar el sitio de combinación de los anticuerpos sintetizados. Hay que recordar que hay cinco tipos diferentes de cadenas pesadas que se distinguen por sus regiones constantes. Los genes que codifican las regiones constantes de las cadenas pesadas (porciones C_H) se aglomeran en un complejo, como se muestra en la figura 17-17. El cambio de clase se logra mediante el movimiento de un gen C_H diferente siguiente al gen VDJ que se había formado antes por la recombinación de DNA. El cambio de clase está bajo la dirección de citocinas secretadas por las células T colaboradoras durante su interacción con la célula B que produce la molécula de anticuerpo. Por ejemplo, una célula T colaboradora que secreta IFN-γ induce un cambio en la célula B adyacente, de la síntesis de IgM a la síntesis de una de las clases de IgG. El cambio de clase permite que un linaje de células B continúe la producción de anticuerpos con la misma especificidad, pero con funciones efectoras distintas (pág. 706).

Complejos antígeno-receptor unidos a la membrana

El reconocimiento del antígeno por los linfocitos B y T ocurre en la superficie celular. Un receptor antigénico en una célula B (un receptor de célula B, o BCR) consiste en una inmunoglobulina unida a la membrana que se une en forma selectiva con



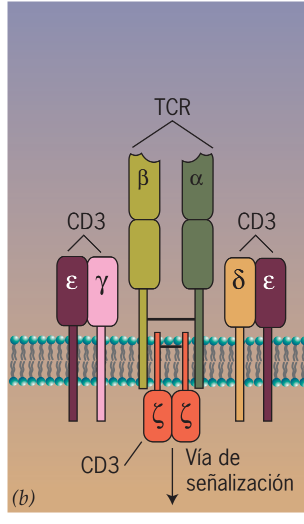


FIGURA 17-18 Estructura de los receptores para antígeno de las células B y T. *a)* El BCR de una célula B es una versión unida con la membrana de una inmunoglobulina relacionada con un par de cadenas α no variables y un par de cadenas β no variables. Las cadenas α y β también son miembros de la superfamilia Ig. *b)* El TCR de una célula T consiste en una cadena polipeptídica α y β unida entre sí por un puente disulfuro. Cada polipéptido contiene un dominio variable que forma el sitio de unión con antígeno y un dominio constante. El TCR se relaciona con seis polipéptidos invariables más de la proteína CD3, como se indica en la ilustración. (Una pequeña fracción de las células T posee un tipo diferente de TCR consistente en una subunidad γ y una δ. Estas células no se limitan al reconocimiento de los complejos MHC-péptido y su función aún no se conoce.)

una porción de un antígeno intacto (es decir, el epitopo) (fig. 17-18*a*). En cambio, el receptor antigénico en una célula T (un receptor de célula T o TCR, fig. 17-18*b*) reconoce y se une con un pequeño fragmento de un antígeno, casi siempre un péptido de unos siete a 25 aminoácidos de largo, que se mantiene en la superficie de otra célula (descrita más adelante). Ambos tipos de receptores para antígenos son parte de grandes complejos de proteína unidos a la membrana que incluyen proteínas invariables, como se muestra en la figura 17-18. Los polipéptidos invariables relacionados con los BCR y TCR tienen un papel clave en la transmisión de señales hacia el interior que inducen cambios en la actividad de las células B o T.

Cada subunidad de un TCR contiene dos dominios similares a Ig, lo que indica que comparten un ancestro común con los BCR. Al igual que las cadenas pesadas y las ligeras de las inmunoglobulinas, uno de los dominios similares a Ig de cada subunidad de un TCR tiene una secuencia de aminoácidos variable; el otro dominio tiene una secuencia constante de aminoácidos (fig. 17-18). Los estudios con cristalografía de rayos X mostraron que los dos tipos de receptores para antígenos también comparten una forma tridimensional similar.

El complejo mayor de histocompatibilidad

Durante la primera parte del siglo xx, los investigadores clínicos descubrieron que la sangre podía transfundirse de una persona a otra, siempre que ambos individuos fueran compatibles respecto del sistema ABO de grupo sanguíneo. El éxito de la transfusión

sanguínea condujo a la proposición de que también podía injertarse piel de un individuo en otro. Esta idea se probó durante la Segunda Guerra Mundial, cuando se intentaron los injertos cutáneos en pilotos y otros militares que habían sufrido quemaduras graves. Los injertos se rechazaron de manera pronta y completa. Después de la guerra, los investigadores se dieron a la tarea de conocer la base del rechazo del tejido. Se descubrió que la piel podía trasplantarse con éxito entre ratones de la misma cepa endogámica, pero que los trasplantes entre ratones de distintas cepas se rechazaban. Los ratones de la misma cepa endogámica son una especie de gemelos y tienen material genético idéntico. Los estudios posteriores revelaron que los genes que regulan el rechazo de tejidos trasplantados se aglomeraban en una región del genoma llamada **complejo mayor de histocompatibilidad** (**MHC**). El MHC consiste en unos 20 genes diferentes, la mayoría de los cuales son muy polimórficos: se han identificado más de 2 000 alelos diferentes de los genes MHC (cuadro 17-3), muchos más que los de cualesquiera otros loci del genoma humano. Por lo tanto, es muy improbable que dos individuos en una población tengan la misma combinación de alelos MHC. Esta es la razón por la que es tan probable que los órganos trasplantados se rechacen y por la que los pacientes deben recibir fármacos, como la ciclosporina A, para suprimir al sistema inmunitario después del trasplante. La ciclosporina A es un péptido cíclico producido por un hongo de tierra e inhibe una fosfatasa particular en la vía de señalización que conduce a la producción de las citocinas necesarias para la activación de células T. Aunque estos fármacos ayudan a prevenir el rechazo del injerto, tornan a los individuos susceptibles a las infecciones oportunistas, por ejemplo las que afectan a las personas con enfermedades por inmunodeficiencia como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Cuadro 17-3 Alelos MHC clase II

Locus	Número de alelos
HLA-DRA	3
HLA-DRB	542
HLA-DQA	34
HLA-DQB	73
HLA-DPA	23
HLA-DPB	125
HLA-DMA	4
HLA-DMB	7
HLA-DOA	12
HLA-DOB	9

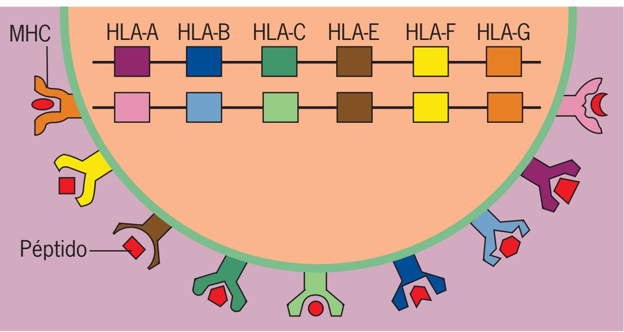
Alelos MHC clase I

Locus	Número de alelos
HLA-A	479
HLA-B	805
HLA-C	257
HLA-E	9
HLA-F	20
HLA-G	7

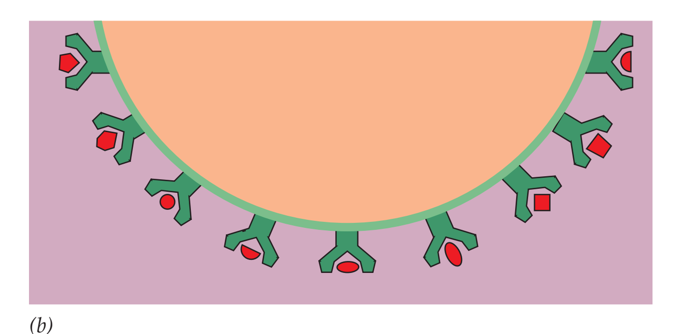
Nota: existen varios otros alelos clase I que no se incluyen.

Es evidente que las proteínas codificadas por el MHC no evolucionaron para prevenir el trasplante de órganos, lo cual conduce a la pregunta sobre su función normal. Mucho después de su descubrimiento como antígenos de trasplante, se demostró que las proteínas MHC participan en la presentación de antígenos. Algunos de los experimentos clave que condujeron a la comprensión actual de la presentación de antígenos se explican en la sección Vías experimentales al final de este capítulo.

Ya antes se mencionó que las células T se activan por un antígeno que antes se dividió en pequeños péptidos y se presenta en la superficie de una célula presentadora de antígeno (una APC). Estos pequeños fragmentos de antígeno se mantienen en la superficie de la APC sujetas por las proteínas MHC. Cada especie de molécula MHC puede unirse con una gran cantidad de péptidos distintos que comparten rasgos estructurales que les permiten ajustarse en su sitio de unión (véase fig. 17-22). Por ejemplo, todos los péptidos capaces de unirse con una proteína codificada por un alelo MHC particular, como HLA-B8, puede contener un aminoácido específico en cierta posición, lo cual le permite ajustarse en el surco de unión a péptido.



(*a*)



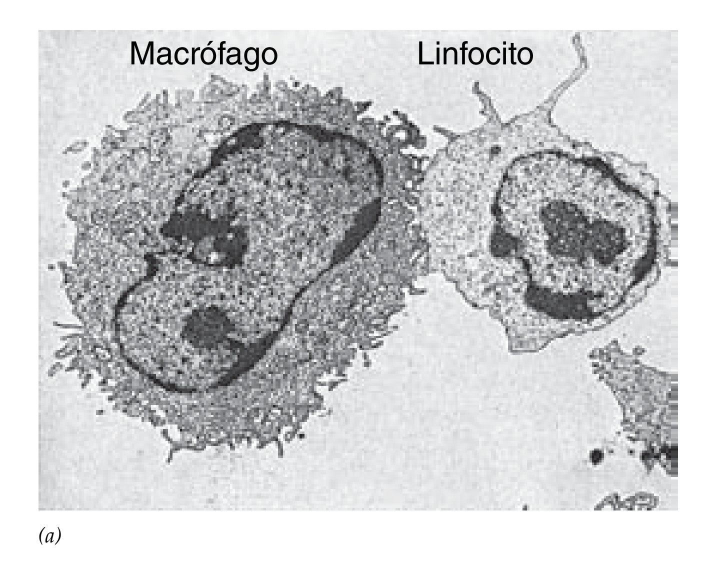
(*b*)

FIGURA 17-19 Las APC humanas pueden presentar gran cantidad de péptidos. *a*) Modelo esquemático de la variedad de moléculas MHC clase I que puede tener un individuo. Como se indica en el cuadro 17-3, esta clase de proteína MHC está codificada por seis alelos, tres de los cuales están representados por una mayor cantidad de alelos. Este individuo particular es heterocigoto en los loci HLA-A, HLA-B y HLA-C y homocigoto en los HLA-E, HLA-F y HLA-G, lo que arroja un total de nueve moléculas MHC clase I distintas. (La diferencia entre MHC clases I y II se describe en la página 713.) *b*) Modelo esquemático que ilustra la variedad de péptidos que puede presentar la proteína codificada con un solo alelo MHC. [El término "HLA" es un acrónimo de antígeno leucocítico humano (*human leucocyte antigen*), lo cual refleja el descubrimiento de esas proteínas en la superficie de leucocitos.]

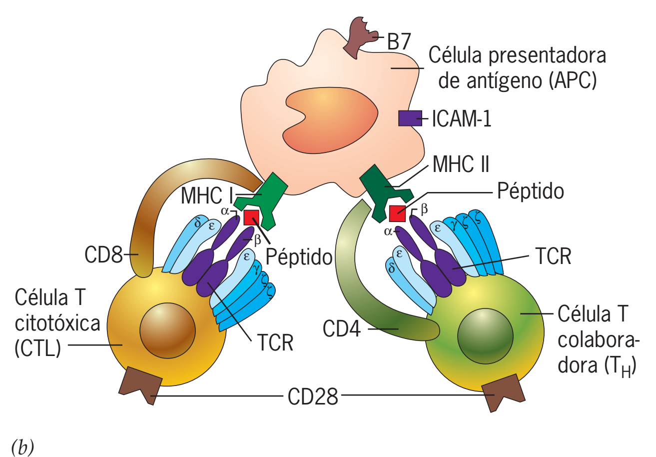
En virtud de que cada individuo expresa varias proteínas MHC distintas (como en la figura 17-19*a*), y que cada variante MHC puede unirse con una gran cantidad de péptidos diferentes (como en la figura 17-19*b*), una célula dendrítica o un macrófago deben ser capaces de presentar una gran variedad de péptidos. Al mismo tiempo, no todas las personas son capaces de presentar todos los péptidos posibles en forma efectiva, lo cual se considera un factor importante para establecer las diferencias de susceptibilidad en una población a distintas enfermedades infecciosas, incluido el sida. Por ejemplo, el alelo HLA-B*35 se relaciona con una progresión rápida a sida declarado, y el alelo HLA-DRB1*1302 se vincula con resistencia a cierto tipo de paludismo e infección por hepatitis B. Los alelos MHC presentes en una determinada población han sido moldeados por selección natural. Las personas con alelos MHC más adecuados para presentar péptidos de un agente infeccioso particular tienen mayor probabilidad de sobrevivir a una infección por ese agente. Por el contrario, las personas que carecen de estos alelos tienen mayor probabilidad de morir sin transmitir sus alelos a los descendientes. Como resultado, las poblaciones tienden a ser más resistentes a las enfermedades a las que se expusieron sus ancestros. Esto podría explicar por qué las poblaciones nativas norteamericanas fueron devastadas por ciertas enfermedades, como el sarampión, que sólo produce síntomas leves en personas con ancestros europeos.

Todo el proceso de la inmunidad mediada por células T se basa en que los pequeños péptidos derivados de las proteínas de un patógeno tienen estructura diferente respecto de los derivados de las proteínas del hospedador. Por consiguiente, uno o más péptidos mantenidos en la superficie de una APC sirven como una pequeña representación del patógeno, proporcionando a las células del sistema inmunitario un "vistazo" del tipo de patógeno que está oculto dentro del citoplasma de la célula infectada. Casi todas las células del cuerpo pueden funcionar como APC. La mayoría presentan el antígeno como una actividad incidental que alerta al sistema inmunitario sobre la presencia de un patógeno, pero algunas APC profesionales (p. ej., células dendríticas, macrófagos y células B) se especializan en esta función, como se explica más adelante en este capítulo.

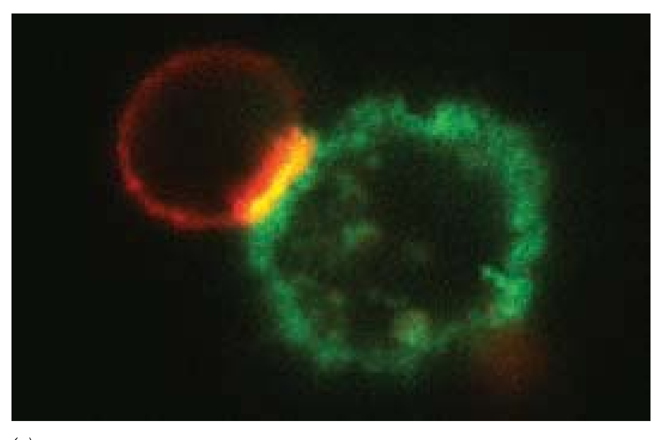
Para que una célula T interactúe con una APC, sus TCR se acoplan con las moléculas MHC que se proyectan en la superficie de la APC (fig. 17-20). Esta interacción pone al TCR de una célula T en una orientación que le permite reconocer el péptido específico presentado dentro de una hendidura de una molécu-



(a)



(b)



(c)

FIGURA 17-20 Interacción entre un macrófago y una célula T durante la presentación del antígeno. *a*) Micrografía electrónica de los dos tipos de células durante su interacción. *b*) Modelo esquemático que muestra algunas de las proteínas que intervienen en la interacción entre una APC y un linfocito T citotóxico (CTL) o célula T colaboradora (T_H). El reconocimiento del antígeno ocurre cuando el TCR de la célula T reconoce un fragmento peptídico del antígeno unido con una hendidura en una molécula MHC de la APC. Como se explica en el texto, los CTL reconocen el antígeno combinado con una molécula MHC clase I, en tanto que las células T_H reconocen el antígeno combinado con una molécula MHC clase II. CD8 y CD4 son proteínas integrales de membrana expresadas por los dos tipos de células T que se unen con las moléculas MHC clases I y II, respectivamente. CD8 y CD4 se describen como correceptores. *c*) Micrografía de fluorescencia que muestra la sinapsis inmunitaria entre una APC y un linfocito T. Los TCR del linfocito T se ven en color verde, y las moléculas MHC II de la APC en rojo. La colocalización de los TCR y las moléculas MHC genera la fluorescencia amarilla en la sinapsis inmunitaria. (*A*, Alan S. Rosenthal, tomada de Regulation of the Immune Response–Role of the Macrophage, New England Journal of Medicine, November 1980, vol. 303, #20, p. 1154. © 1980 Massachusetts Medical Society; *B*, Tomada de L. Chatenoud, Mol. Med. Today 4:26, 1998, con autorización de Elsevier Science; *C*, Tomada de Brian A. Cobb, et al., Cell 117:683, 2004, cortesía de Dennis L. Kasper; con autorización de Cell Press.)

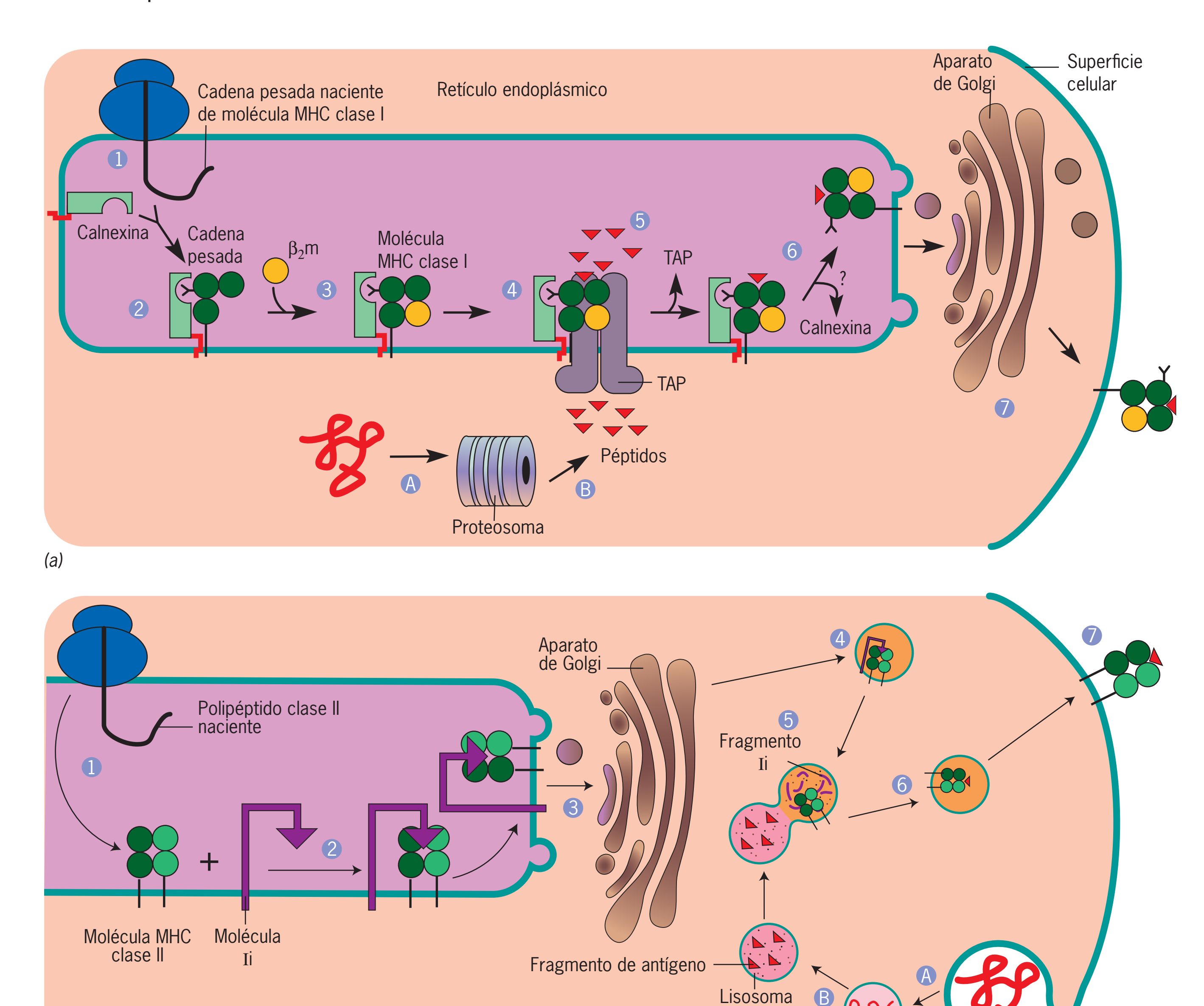


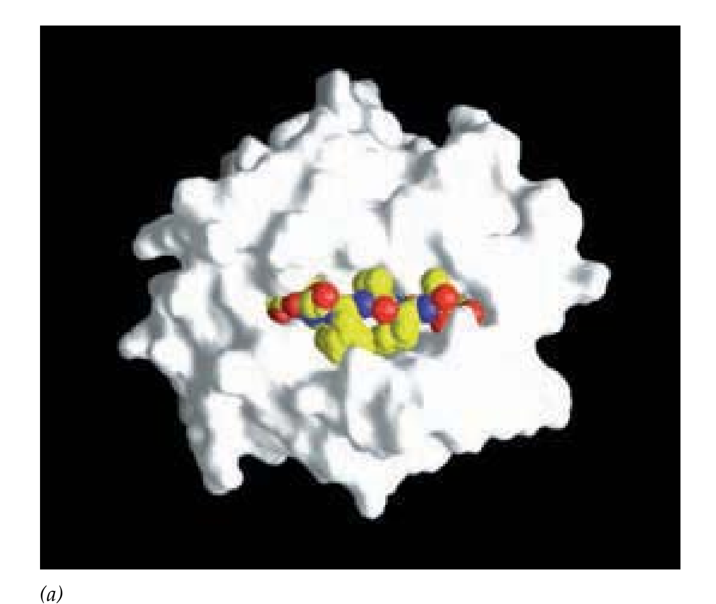
FIGURA 17-21 Vías de procesamiento para antígenos que se relacionan con las moléculas MHC clases I y II. *a)* Vía propuesta para el ensamble de un complejo MHC clase I-péptido. En el paso 1, la cadena pesada de la proteína MHC se sintetiza en un ribosoma unido con la membrana y se transloca a la membrana del retículo endoplásmico. La cadena pesada de MHC se relaciona con la calnexina (paso 2), una chaperona en la membrana del retículo endoplásmico, y el complejo dimérico se une con la cadena invariable β_2m (paso 3). Después, el complejo MHC se vincula con otra proteína de la membrana del retículo endoplásmico, TAP (paso 4). Mientras tanto, los proteasomas captan los antígenos citosólicos (paso A) y los degradan en péptidos pequeños (paso B). La proteína TAP transporta los péptidos a la luz del retículo endoplásmico, donde se unen dentro de la hendidura de la molécula MHC (paso 5). La calnexina y TAP se disocian del complejo MHC (paso 6), el cual se transporta por la vía biosintética y secretora por el aparato de Golgi (paso 7) hasta la membrana plasmática, donde está listo para interactuar con el TCR de un linfocito T citotóxico. *b)* Vía propuesta para el ensamble de un complejo MHC clase II-péptido. En el paso 1, la proteína MHC se sintetiza en un ribosoma unido con la membrana y se traslada a la membrana del retículo endoplásmico, donde se relaciona con Ii (paso 2), una proteína que bloquea el sitio de unión MHC-péptido. El complejo MHC-Ii pasa por el aparato de Golgi (paso 3) hasta una vesícula de transporte (paso 4). Mientras tanto, la APC capta un antígeno proteico extracelular por endocitosis (paso A) y lo entrega a un lisosoma (paso B), donde el antígeno se fragmenta en péptidos. El lisosoma que posee fragmentos antigénicos se fusiona con la vesícula de transporte que contiene el complejo MHC-Ii (paso 5), lo cual da lugar a la degradación de la proteína Ii y la relación entre el fragmento peptídico antigénico y la molécula MHC clase II (paso 6). El complejo MHC-péptido se transporta a la membrana plasmática (paso 7), donde está listo para interactuar con el TCR de una célula T_H. (*A*, TOMADA DE D. B. WILLIAMS, ET AL. TRENDS CELL BIOL 6:271, 1996, CON AUTORIZACIÓN DE ELSEVIER SCIENCE.)

la MHC. La interacción entre las proteínas MHC y los TCR se fortalece por los contactos adicionales que se forman entre los componentes de la superficie celular, como ocurre entre las moléculas CD4 o CD8 en una célula T y las proteínas MHC en una APC (fig. 17-20). Esta región especializada que se desarrolla ante una célula T y una APC se conoce como *sinapsis inmunitaria*.

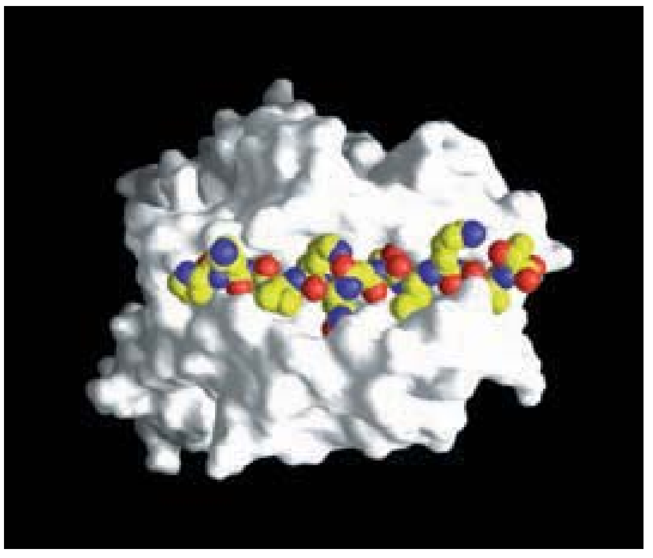
Las proteínas MHC pueden subdividirse en dos grupos principales, moléculas **MHC clases I** y **II**. Las moléculas MHC clase I consisten en una cadena polipeptídica codificada por un alelo MHC (conocido como la cadena pesada) relacionado en forma no covalente con un polipéptido no MHC denominado microglobulina β_2 (véase fig. 1, pág. 722). Las diferencias en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada son las causantes de los drásticos cambios en la forma de la hendidura de unión con péptido de la molécula. Las moléculas MHC clase II también consisten en un heterodímero, pero ambas subunidades están codificadas por alelos MHC. Ambas clases de moléculas MHC, así como la microglobulina β_2, contienen dominios similares a Ig y, por tanto, son miembros de la superfamilia de la inmunoglobulina. En tanto que la mayoría de las células del cuerpo expresan moléculas MHC clase I en su superficie, las moléculas MHC clase II lo hacen sobre todo en las APC profesionales.

Las dos clases de moléculas MHC presentan antígenos provenientes de distintos sitios de una célula, aunque hay informes de algunas superposiciones. Las moléculas MHC clase I son las principales encargadas de presentar antígenos que se originan en el citosol de una célula, esto es, proteínas *endógenas*. En cambio, las moléculas MHC clase II presentan sobre todo fragmentos de antígenos exógenos que ingresan a la célula por fagocitosis. Las vías propuestas por las cuales estas dos clases de moléculas MHC captan y presentan sus fragmentos de antígeno en la membrana plasmática se describen a continuación y se muestran en la figura 17-21.

- ***Procesamiento de los complejos péptido-MHC clase I*** (fig. 17-21*a*). Los antígenos localizados en el citosol de una APC se degradan hasta pequeños péptidos por acción de proteasas que forman parte de los proteasomas celulares (pág. 537). Estas proteasas dividen proteínas citosólicas en fragmentos de unos ocho a 10 residuos de largo, adecuados para unirse con una hendidura de una molécula MHC clase I (fig. 17-22*a*). Luego, los péptidos se transportan por la membrana del retículo endoplásmico rugoso y hacia la luz de éste mediante una proteína dimérica llamada TAP (fig. 17-21*a*). Una vez en la luz del retículo endoplásmico, el péptido puede unirse con una molécula MHC clase I recién sintetizada, que es una proteína integral de la membrana del retículo endoplásmico. El complejo MHC-péptido se mueve por la vía biosintética (fig. 8-2*b*) hasta llegar a la membrana plasmática, donde se presenta el péptido.
- ***Procesamiento de los complejos péptido-MHC clase II*** (fig. 17-21*b*). Las moléculas MHC clase II también se sintetizan como proteínas de membrana del retículo endoplásmico rugoso, pero se unen de manera no covalente con una proteína llamada Ii, que bloquea el sitio de unión con péptido de la molécula MHC (fig. 17-21*b*). Después de su síntesis, el complejo MHC clase II-Ii sale del retículo endoplásmico por la vía biosintética, guiada por secuencias directrices localizadas dentro del dominio citoplásmico de Ii. Se cree



(a)



(b)

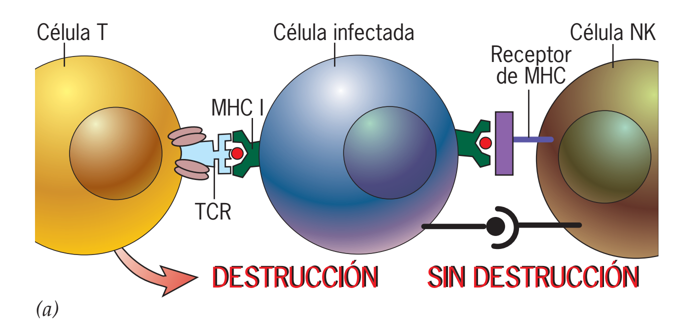
FIGURA 17-22 Los péptidos producidos por procesamiento de antígeno se unen dentro de una hendidura de la molécula de proteína MHC. Estos modelos ilustran la unión de los péptidos de una molécula MHC clase I (*a*) y una MHC clase II (*b*). Las superficies de las moléculas MHC se muestran en blanco y el péptido en el sitio de unión, en color. El péptido de (*a*) deriva de la proteína de la matriz del virus de la influenza y el péptido de (*b*) proviene de la proteína hemaglutinina del virus de la influenza. El extremo N de cada péptido está a la izquierda. (*A* Y *B*, POR CORTESÍA DE T. JARDETZKY; TOMADA DE TRENDS BIOCHEM SCI 22:378, 1997, CON AUTORIZACIÓN DE ELSEVIER SCIENCE.)

que las moléculas MHC clases I y II se separan unas de otras en la red *trans* de Golgi (TGN), que es el compartimiento principal de clasificación en la vía biosintética (pág. 302). Un complejo péptido-MHC clase I se dirige hacia la superficie celular, en tanto que el complejo MHC clase II-Ii lo hace a un endosoma o lisosoma, donde se digiere la proteína Ii por acción de proteasas ácidas. Después se libera una molécula MHC clase II y se une con péptidos digeridos de los antígenos que ingresaron a la célula y se dirige por la vía endocítica (fig. 17-21*b*).[5] Más tarde, el complejo péptido-MHC clase II se traslada a la membrana plasmática, donde se presenta, como se muestra en la figura 17-22*b*.

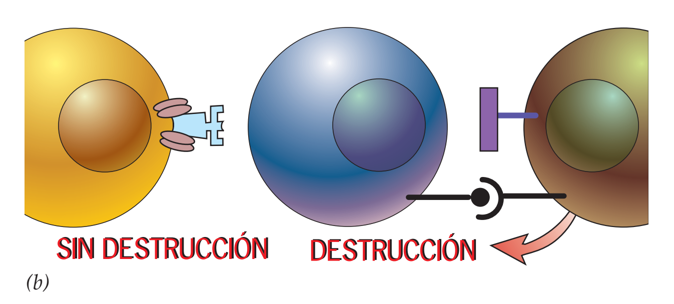
Una vez en la superficie de una APC, las moléculas MHC dirigen la interacción de la célula con los distintos tipos de células T (fig. 17-20). Los linfocitos T citotóxicos (CTL) reconocen su antígeno relacionado con la molécula MHC clase I; se dice que están *restringidos a MHC clase I*. En circunstancias normales, las células del cuerpo que entran en contacto con los CTL presentan fragmentos de sus propias proteínas normales relacionadas con sus moléculas MHC clase I. Las células T ignoran a las células normales que presentan fragmentos de proteínas normales, ya que las células T capaces de unirse con gran afinidad con péptidos derivados de las proteínas celulares normales se eliminan durante su desarrollo en el timo. En cambio, cuando una célula está infectada, presenta fragmentos de las proteínas víricas relacionadas con sus moléculas MHC clase I. Los CTL reconocen a las células que tienen TCR con sitios de unión complementarios con los péptidos víricos y la célula infectada se destruye. Es probable que la presentación de un solo péptido ajeno en la superficie de una célula sea suficiente para suscitar el ataque de un CTL. Como virtualmente todas las células del cuerpo expresan moléculas MHC clase I en su superficie, los CTL pueden combatir una infección sin importar el tipo de célula afectada. Los CTL también reconocen y destruyen células que presentan proteínas anormales (mutadas) en su superficie, lo cual participa en la eliminación de células tumorales que pudieran poner en riesgo la vida.

Se descubrió otra función de las moléculas MHC clase I. Una de las medidas empleadas por algunos virus para evadir el sistema inmunitario del hospedador consiste en suprimir la expresión de las moléculas MHC clase I. Esto hace que la célula infectada sea "invisible" para las células T citotóxicas. Algunas células tumorales metastásicas también pierden la expresión del MHC. Aunque estas células pueden volverse resistentes al ataque de los CTL, se tornan sensibles al ataque de otra rama del sistema de defensa del cuerpo, las células NK del sistema inmunitario innato (pág. 696). Las células NK tienen receptores superficiales que reconocen las proteínas MHC clase I propias en las superficies de las demás células del cuerpo. Cuando estos receptores se unen con proteínas MHC clase I de una célula normal, se inhibe la actividad citotóxica de la célula NK. Sin embargo, cuando una célula infectada pierde una o más de sus proteínas MHC clase I, se convierte en blanco para las células NK (fig. 17-23).

En cambio, con los CTL las células T colaboradoras reconocen a su antígeno relacionado con las moléculas MHC clase II; se dice que están *restringidas a MHC clase II*. Como consecuencia, las células T colaboradoras se activan sobre todo por antígenos exógenos (p. ej., extraceluares) (fig. 17-21*b*), como los que forman parte de las paredes celulares bacterianas o toxinas bacterianas. Las moléculas MHC clase II se encuentran en particular en las células B, células dendríticas y macrófagos. Éstas son las células linfoides que ingieren materiales ajenos extracelulares y presentan los fragmentos a las células T colaboradoras, como se explica más adelante. Las células T colaboradoras que se activan de esta forma pueden estimular a las células B para producir anticuerpos solubles, que se unen con antígenos exógenos siempre que se localicen en el cuerpo.



(a)



(b)

FIGURA 17-23 Proteínas MHC e infecciones víricas. *a*) Los linfocitos T citotóxicos (CTL) reconocen células infectadas por los péptidos víricos que se presentan en combinación con la molécula MHC. Por otro lado, las células destructoras naturales (NK) no matan a la célula que presenta las moléculas MHC, aun cuando esté infectada. *b*) Algunos virus evaden la destrucción por los CTL porque hacen que la célula huésped suspenda la presentación de moléculas MHC. La ausencia de proteínas MHC en la superficie celular la convierte en blanco para una célula NK. (Reimpreso con autorización de K. Karre y R. M. Welsh, Nature 386:446, 1997; © por Macmillan Magazines Limited.)

Es obvio que las moléculas MHC son importantes en la presentación de antígenos, pero si ésta fuera la única función del MHC, no se esperaría que los loci genéticos que codifican estas proteínas fueran tan polimórficos (cuadro 17-3). Durante mucho tiempo se ha conjeturado que el polimorfismo del MHC otorga a los miembros de una población una individualidad por la cual pueden distinguirse de los otros miembros. La evidencia que favorece esta idea se obtuvo hace poco de una serie de fascinantes estudios del comportamiento, en ratones y seres humanos. Estos estudios indican que las diferencias características en el olor corporal entre una persona y otra (o entre ratones de distintas cepas endogámicas) pueden atribuirse a las diferencias en alelos MHC específicos. Es posible que estas diferencias provengan de las proteínas MHC solubles excretadas en

[5] Los péptidos generados en los lisosomas y unidos a moléculas MHC clase II tienden a ser más largos (10 a 25 residuos) que los generados en los proteasomas y unidos a moléculas MHC clase I (ocho a 10 residuos).

el sudor y los efectos de estas proteínas en el crecimiento de la flora bacteriana. El MHC no sólo contribuye al olor corporal, sino también a la percepción olfativa, sobre todo en las hembras de los mamíferos. Los estudios indican que las preferencias para el apareamiento en ratones están muy influidas por los genotipos MHC y quizá lo mismo suceda con las personas. Esto lo apoya un estudio en el que un grupo de mujeres recibió prendas de ropa sudadas que habían usado distintos hombres y luego se les pidió que eligieran los artículos con aroma más agradable. Por lo general, las prendas elegidas eran de varones cuyos loci MHC eran los más distintos a los suyos propios. El apareamiento entre sujetos con diferentes alelos MHC produciría descendientes con la mayor variedad de moléculas MHC, lo que a su vez les daría la capacidad para presentar la mayor variedad de péptidos.

Distinción entre lo propio y lo ajeno

Las células T obtienen su identidad en el timo. Cuando una célula germinal migra de la médula ósea al timo, carece de proteínas superficiales que medien la función de la célula T, en especial los TCR. Las células T proliferan en el timo para generar una población de precursores de células T. Después, cada una de estas células se somete a recombinaciones de DNA que le permiten producir un TCR específico. Luego, estas células se someten a un complejo proceso de detección en el timo en el que se seleccionan las células con receptores de células T potencialmente útiles (fig. 17-24). Algunos estudios sugieren que el timo produce pequeñas cantidades de una gran variedad de proteínas que en condiciones normales se encuentran en cualquier parte del cuerpo. Es probable que la producción de estas proteínas esté bajo el control de un factor de transcripción especial (llamado AIRE) que sólo se halla en el timo. De acuerdo con este modelo, el timo recrea un ambiente en el que las células T en desarrollo pueden tomar muestras de proteínas que contienen una gran variedad de los epitopos únicos del propio cuerpo. Las células T cuyos TCR tienen una gran afinidad por péptidos derivados de proteínas del propio cuerpo se destruyen (fig. 17-24*a*). Este proceso de *selección negativa* disminuye de forma notoria la probabilidad de que el sistema inmunitario ataque a sus propios tejidos. Las personas que carecen de un gen *AIRE* funcional sufren de una rara pero grave enfermedad autoinmunitaria.

La generación de células T requiere más que la selección negativa. Cuando un TCR interactúa con un péptido extraño en la superficie de una APC, debe reconocer al péptido y la molécula MHC que lo sujeta (se explica en la página 723). Por consiguiente, las células T cuyos TCR no reconocen moléculas MHC propias tienen poco valor. El sistema inmunitario detecta tales células porque requiere que las células T reconozcan los complejos péptidos propios-MHC-propios con baja afinidad. Las células T cuyos TCR son incapaces de reconocer los complejos MHC propios sufren apoptosis en el timo en un proceso llamado "muerte por negligencia" (fig. 17-24*b*). En cambio, las células T cuyos TCR muestran un reconocimiento débil (baja afinidad) hacia los complejos péptidos propios-MHC-propios se estimulan para que permanezcan vivas, pero no se activan (fig. 17-24*c*). Este proceso de supervivencia selectiva se conoce como *selección positiva*. Se estima que menos de 5% de las células T tímicas sobrevive a estos fenómenos de selección positiva y negativa.[6]

Se piensa que las células que reconocen moléculas MHC clase I se convierten en linfocitos T citotóxicos ($CD4^-CD8^+$), y las que reconocen moléculas MHC clase II se convierten en linfocitos T colaboradores ($CD4^+CD8^-$). Ambos tipos de células T salen del timo y circulan por periodos prolongados por la sangre y la linfa. En esta etapa, las células T se describen como células T *inocentes* porque aún no se encuentran con el antígeno específico con el que puede unirse su TCR. A medida que pasan por los tejidos linfoides, las células T inocentes entran en contacto con varias células que mantienen su supervivencia en un estado de reposo o inducen su activación.

Conforme se filtran por los ganglios linfáticos y otros tejidos linfáticos periféricos, las células T exploran las superficies de las células en busca de un péptido inapropiado unido con una molécula con MHC propio. Las células T $CD4^+$ se activan por un péptido ajeno unido con una molécula de MHC clase II propia, mientras que las células T $CD8^+$ se activan con péptidos extraños unidos con una molécula de MHC propia de clase I. Las células T $CD8^+$ también responden con intensidad a las células que tienen moléculas de MHC ajenas, como las células de un órgano trasplantado de un donante no compatible. En este último caso, inician un amplio ataque contra las células del injerto, lo cual puede producir el rechazo del órgano. En condiciones fisiológicas normales, se impide la activación de los linfocitos

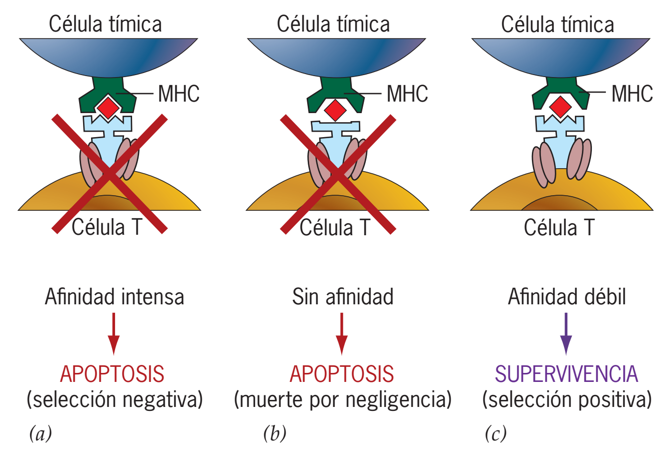


FIGURA 17-24 Determinación del destino de una célula T recién formada en el timo. En el timo se lleva a cabo un proceso de detección que selecciona las células T con los TCR apropiados. *a*) Las células T cuyo TCR posee una gran afinidad por moléculas MHC que llevan péptidos propios se eliminan por apoptosis (selección negativa). *b*) Las células T cuyo TCR no reconoce a las moléculas MHC que llevan péptidos propios también mueren por apoptosis (muerte por negligencia). *c*) En cambio, las células T cuyo TCR muestra una débil afinidad por moléculas MHC con péptidos propios sobreviven (selección positiva) para constituir la población de células T periféricas del cuerpo.

[6] Las células B son sujetas a procesos selectivos que causan la muerte o desactivación de aquellas capaces de producir anticuerpos autorreactivos. En algunos casos las cadenas ligeras de anticuerpos autorreactivos son sustituidas por una nueva cadena ligera codificada por un gen de Ig que ha sido reordenado secundariamente en un proceso llamado edición de receptor.

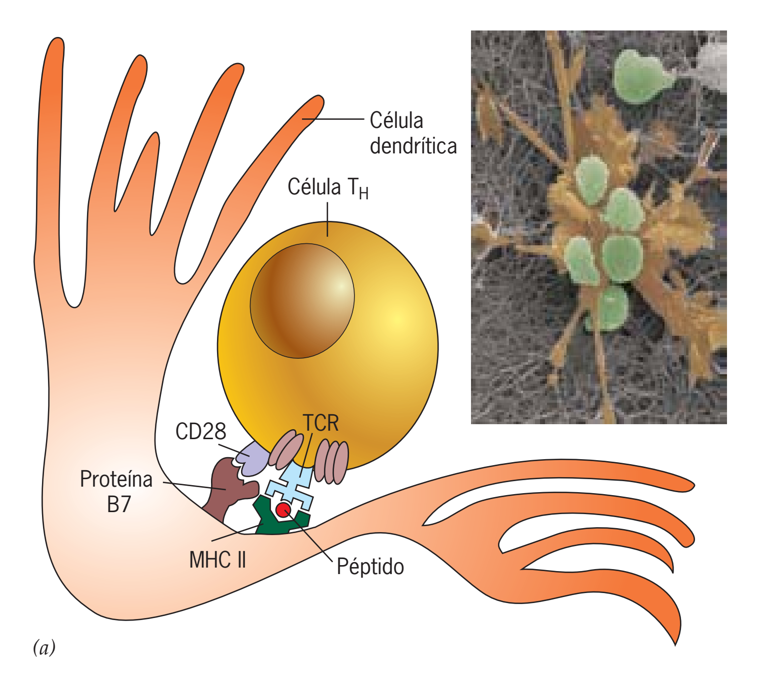
autorreactivos (linfocitos capaces de reaccionar con los propios tejidos del cuerpo) mediante varios mecanismos que aún no se comprenden y operan fuera del timo, en los tejidos periféricos. Como se explica en la sección Perspectiva humana, una falla en estos mecanismos conduce a la producción de anticuerpos y células T autorreactivas que causan daño hístico crónico.

Los linfocitos se activan por señales en la superficie de las células

Los linfocitos se comunican con otras células mediante varias proteínas situadas en la superficie de las células. Como se explicó antes, la activación de las células T requiere la interacción entre el TCR de la célula T y un complejo péptido-MHC en la superficie de otra célula. Esta interacción brinda la especificidad, la cual asegura que sólo se activen las células T que puedan unirse con el antígeno. La activación de las células T también requiere una segunda señal, la llamada *señal coestimulante*, que proviene de un segundo tipo de receptor en la superficie de una célula T. Dicho receptor es distinto y está separado del TCR. A diferencia del TCR, el receptor que emite la señal coestimulante no es específico para un antígeno particular y no necesita unirse con una molécula MHC. La mejor estudiada de estas interacciones es la que sucede entre las células T colaboradoras y las células presentadoras de antígeno profesionales (p. ej., células dendríticas y macrófagos).

Activación de las células T colaboradoras por las APC profesionales Las células T_H reconocen fragmentos de antígeno en la superficie de las células dendríticas y macrófagos que se alojan en la hendidura de unión de las moléculas MHC clase II. Una señal coestimulante llega a la célula T_H como resultado de la interacción entre una proteína conocida como CD28 en la superficie de la célula T_H y un miembro de la familia B7 de proteínas en la superficie de la APC (fig. 17-25*a*). La proteína B7 aparece en la superficie de la APC después que el fagocito ingiere el antígeno ajeno. Si la célula T_H no recibe esta segunda señal de la APC, en lugar de activarse la célula T_H se vuelve no reactiva (anérgica) o se destina a la apoptosis (se borra). Como las APC profesionales son las únicas células capaces de emitir una señal coestimulante, son las únicas que pueden iniciar una respuesta de las células T_H. Como resultado, las células normales del cuerpo que tienen proteínas capaces de combinarse con los TCR de una célula T no pueden activar a las células T_H. Por lo tanto, el requerimiento de una célula T_H de dos señales de activación protege a las células normales del cuerpo contra un ataque autoinmunitario por las células T colaboradoras.

Antes de su interacción con una APC, una célula T_H puede describirse como una célula en reposo, es decir, una que se retiró



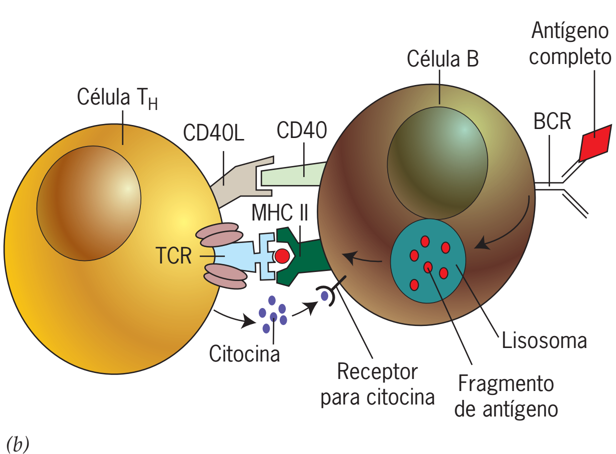


FIGURA 17-25 Activación de linfocitos. *a*) Esquema de la interacción entre una APC profesional, en este caso una célula dendrítica madura, y una célula T_H. La especificidad en esta interacción entre células deriva de la identificación que hace el TCR de la célula T_H del complejo MHC clase II-péptido presentado en la superficie de la célula dendrítica. La interacción entre CD28 de la célula T y una proteína B7 de la célula dendrítica genera una señal coestimuladora inespecífica necesaria para la activación de la célula T. (Recuadro) Micrografía electrónica de barrido de una célula dendrítica madura (anaranjado) que presenta antígeno a varias células T (verde). *a*) Esquema de la interacción entre una célula T_H activada y una célula B. La especificidad de esta interacción entre células deriva del reconocimiento que hace el TCR en la célula T_H del complejo MHC clase II-péptido presentado en la superficie de la célula B. El péptido presentado por la célula B procede de las moléculas de proteína que al principio se unieron a los BCR en la superficie celular. Estos antígenos unidos se captan por endocitosis, se fragmentan en los lisosomas y se unen a moléculas MHC clase II, como en la figura 17-21*b*. (Tomada de E. Lindhout et al. Immunol Today 18:574, 1997; con autorización de Elsevier Science. Micrografía del recuadro: reimpresa con autorización de P. Friedl, A. T. den Boer, y M. Gunzer, Nature Revs. Immunology 5:533, 2005; © 2005, por Macmillan Magazines Limited.)

del ciclo celular (una célula en G_0, pág. 572). Una vez que recibe la doble señal de activación, la célula T_H se estimula para reingresar a la fase G_1 del ciclo celular y al final pasar por la fase S y la mitosis. Por lo tanto, la interacción de las células T con un antígeno específico induce la proliferación (*expansión clonal*) de las células capaces de responder a ese antígeno. Además de inducir la división celular, la activación de una célula T_H hace que sintetice y secrete citocinas (en particular IL-2). Las citocinas producidas por células T_H activadas actúan sobre otras células del sistema inmunitario (incluidas células B y macrófagos), así como otra vez en las células T_H que secretaron las moléculas. El cuadro 17-1 muestra la fuente y función de varias citocinas.

En este capítulo se ha descrito cómo las reacciones inmunitarias se estimulan por ligandos que activan las vías de señalización de los receptores. Sin embargo, muchos de estos fenómenos también dependen de estímulos inhibidores, por lo que la respuesta final de la célula depende del equilibrio entre las influencias positivas y negativas. Por ejemplo, la interacción entre CD28 y una proteína B7 emite una señal positiva para la célula T que conduce a su activación. Una vez que la célula T se activa, produce otra proteína de la superficie celular llamada CTLA4 con estructura similar a CD28 y que también interactúa con las proteínas B7 de la APC. No obstante, a diferencia de la interacción CD28-B7, el contacto entre CTLA4 y B7 conduce a la inhibición de la respuesta de la célula T y no a su activación. La necesidad de equilibrio entre la activación y la inhibición es más evidente en los ratones que se modificaron mediante ingeniería genética para que no tuvieran el gen que codifica CTLA4. Estos ratones mueren como consecuencia de una proliferación masiva de células T. Como se hace notar en la página 720, en fecha reciente se dio uso clínico al conocimiento sobre la función de CTLA4.

Activación de células B por las células T_H Las células T_H se unen con células B cuyos receptores reconocen al mismo antígeno. Al principio, el antígeno se une con la inmunoglobulina (BCR) en la superficie de la célula B. Los antígenos captados por células B pueden ser proteínas solubles del medio extracelular o proteínas unidas a la membrana plasmática de otras células. En el segundo caso, la célula B obtiene el antígeno extendiéndose sobre la superficie externa de la célula blanco y reuniendo los complejos BCR-antígeno en una masa central. Luego, el antígeno unido se introduce a la célula B, donde se procesa por medios enzimáticos y sus fragmentos se presentan combinados con las moléculas MHC clase II (fig. 17-25*b*). El reconocimiento del fragmento peptídico por el TCR conduce a la activación de la célula T_H, la cual responde mediante activación de la célula B. La activación de una célula B se alcanza después de la transmisión de varias señales de la célula T_H a la célula B. Algunas de estas señales se transmiten en forma directa de una superficie celular a la otra mediante la interacción entre proteínas complementarias, como CD40 y el ligando de CD40 (CD40L) (fig. 17-25*b*). La unión de CD40 y CD40L genera señales que ayudan a la célula B a pasar del estado G_0 al ciclo celular. Otras señales se transmiten por citocinas liberadas por la célula T hacia el espacio que la separa de la célula B cercana. Este proceso es parecido a la manera en que los neurotransmisores actúan a través de una sinapsis neural (pág. 168). Las citocinas que liberan las células T hacia la "sinapsis inmunitaria" incluyen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Se cree que la interleucina 4 estimula a la célula B para cambiar de la producción de la clase IgM a la clase IgG o IgE. Otras citocinas inducen la proliferación, diferenciación y actividades secretoras de las células B.

Vías de transducción de señales en la activación de linfocitos

En el capítulo 15 se explicó la manera en que las hormonas, factores de crecimiento y otros mensajeros químicos se unen con receptores en las superficies externas de las células blanco, para iniciar un proceso de transducción de señal que transmite información a los compartimientos internos de la célula. En ese capítulo se explicó el modo en el cual una gran variedad de moléculas mensajeras extracelulares transmite información por unas cuantas vías de transducción de señales. La estimulación de los linfocitos ocurre por un mecanismo similar y emplea muchos de los mismos componentes utilizados por las hormonas y factores de crecimiento que actúan sobre otros tipos de células.

Cuando una célula T se activa por una célula dendrítica, o una célula B por una T_H, las señales se transmiten de la membrana plasmática al citoplasma mediante cinasas de tirosina, similares a las señales descritas en el capítulo 15 para insulina y los factores de crecimiento. A diferencia de los receptores para insulina y factores de crecimiento (pág. 636), los receptores antigénicos de los linfocitos carecen de actividad cinasa de tirosina inherente. En lugar de ello, la unión del ligando con los receptores de antígeno da lugar al reclutamiento de moléculas citoplásmicas de esta enzima hacia la superficie interna de la membrana plasmática. Se cree que este proceso se facilita por el movimiento de receptores activados hacia las balsas de lípidos (pág. 138). Se han referido cinasas de tirosina distintas en la transducción de señal durante la activación de linfocitos, incluidos miembros de las familias Src y Tec. Src fue la primera cinasa de tirosina en identificarse y es el producto del primer oncogén causante de cáncer que se descubrió (sección 16.3).

La activación de estas cinasas de tirosina inicia una cascada de fenómenos y la activación de muchas vías de transducción de señal, incluidas las siguientes:

1. Activación de la fosfolipasa C, que da origen a la formación de trifosfato de inositol y diacilglicerol. Como se explica en la página 628, el trifosfato de inositol causa un aumento marcado de los niveles de Ca^{2+} citosólico, mientras que el diacilglicerol estimula la cinasa de proteína C.
2. Activación de Ras, que deriva en la activación de la cascada de cinasas de MAP (pág. 640).
3. Activación de PI3K, enzima que cataliza la formación de mensajeros lipídicos unidos con la membrana que tienen diversas funciones en la célula (pág. 644).

La transmisión de señales por estas vías diversas y otras más conduce a la activación de varios factores de transcripción (p. ej., NF-κB y NFAT), así como a la transcripción resultante de docenas de genes que no se expresan en las células B o T en reposo.

Como se mencionó antes, una de las respuestas más importantes de un linfocito activado es la producción y secreción de citocinas, algunas de las cuales pueden actuar de nueva cuenta sobre la célula que las liberó. Al igual que otras señales extracelulares, las citocinas se unen con receptores en la superficie de las

células blanco, lo que genera señales citoplásmicas que actúan en varios blancos intracelulares. Las citocinas usan una vía nueva de transducción de señal conocida como *vía JAK-STAT*, que opera sin la participación de segundos mensajeros. La porción "JAK" del nombre es un acrónimo para cinasas de Jano, una familia de cinasas de tirosina citoplásmicas cuyos miembros se activan después de la unión de una citocina a un receptor en la superficie celular. (Jano era un dios romano de dos caras que protegía las entradas y las puertas.) STAT es el acrónimo de "transductores de señal y activadores de la transcripción" (del inglés *signal transducers and activators of transcription*), una familia de factores de transcripción que se activan cuando uno de sus residuos de tirosina se fosforila por efecto de una JAK (véase fig. 15-17*c*). Una vez fosforiladas, las moléculas STAT interactúan para formar dímeros que se trasladan del citoplasma al núcleo, donde se unen con secuencias específicas de DNA, como un elemento de respuesta estimulado por interferón (ISRE). Los ISRE se encuentran en las regiones reguladoras de alrededor de una docena de genes que se activan cuando la célula se expone a la citocina interferón alfa (IFN-α).

Como sucede con las hormonas y factores de crecimiento que se describieron en el capítulo 15, la respuesta específica de una célula depende del receptor de citocina particular que participe y las JAK y STAT particulares que se encuentren en esa célula. Por ejemplo, ya se mencionó antes que IL-4 induce el cambio de clase de inmunoglobulina en las células B. Esta respuesta sigue a la fosforilación inducida por IL-4 del factor de transcripción STAT6, que se halla en el citoplasma de las células B activadas. La resistencia a la infección vírica inducida por interferones (pág. 696) está mediada por la fosforilación de STAT1. La fosforilación de otras moléculas STAT puede conducir a la progresión de la célula blanco por el ciclo celular.

REVISIÓN ?

1. Dibuje la estructura básica de una molécula de IgG unida con un epitopo de un antígeno. Señale las cadenas pesadas y las ligeras; las regiones variables y constantes de cada cadena, y las regiones que contienen las secuencias hipervariables.
2. Dibuje la organización básica de los genes de la línea germinal que participan en la codificación de las cadenas ligeras y pesadas de una molécula de IgG. ¿En qué difiere de su disposición en el genoma de una célula productora de anticuerpo?, ¿qué pasos suceden para producir esta recombinación de DNA?
3. Mencione tres mecanismos diferentes que contribuyan a la variabilidad en las regiones V de las cadenas de anticuerpos.
4. Compare y analice la estructura de los receptores de antígeno en las células B y T.
5. Describa los pasos del procesamiento de un antígeno citosólico en una APC. ¿Cuál es el papel de las proteínas MHC en este proceso?
6. Mencione las similitudes y diferencias de las funciones de una molécula MHC clase I y una de clase II. ¿Qué tipos de APC utiliza cada clase de molécula MHC y qué tipos de células las reconocen?
7. Describa los pasos comprendidos entre la etapa en que un macrófago ingiere una bacteria y la etapa en la que las células plasmáticas producen anticuerpos que se unen a la bacteria y neutralizan su capacidad infecciosa.

PERSPECTIVA HUMANA

Enfermedades autoinmunitarias

El sistema inmunitario requiere interacciones complejas y muy específicas entre muchos tipos diferentes de células y moléculas. Deben ocurrir muchos fenómenos para que pueda iniciarse una reacción inmunitaria humoral o mediada por células, lo cual hace a estos procesos susceptibles de interrupción en varias etapas por interferencia de muchos factores. Entre los diversos tipos de disfunciones inmunitarias figuran las **enfermedades autoinmunitarias**, que se producen cuando el cuerpo establece una reacción inmunitaria contra una parte de sí mismo.

Como la especificidad de los receptores para antígeno de las células T y B se establece por un proceso de recombinación génica aleatoria, es inevitable que algunos miembros de estas poblaciones celulares tengan receptores dirigidos contra las propias proteínas del cuerpo (*antígenos propios*). Los linfocitos que se unen con los antígenos propios con gran afinidad tienden a eliminarse de la población linfocitaria, lo que torna al sistema inmunitario *tolerante* consigo mismo. Sin embargo, algunos de los linfocitos autorreactivos generados en el timo y la médula ósea escapan de los procesos de selección negativa del cuerpo, lo que les confiere el *potencial* para atacar tejidos normales del cuerpo. La presencia de linfocitos B y T capaces de reaccionar contra los tejidos del cuerpo, es fácil de mostrar en individuos sanos. Por ejemplo, cuando se aíslan células T de la sangre y se tratan in vitro con una proteína propia normal, junto con la citocina IL-2, es probable que una pequeña cantidad de células de la población prolifere para formar un clon de células que reacciona con el antígeno propio. De igual manera, si se inyectan animales de laboratorio con una proteína propia purificada junto con un *coadyuvante*, que es una sustancia inespecífica que intensifica la respuesta al antígeno inyectado, establecen una reacción inmunitaria contra los tejidos en los que se encuentra esa proteína. En circunstancias normales, las células B y T capaces de reaccionar con antígenos propios se suprimen por varios mecanismos. Cuando estos mecanismos fallan, es probable que la persona sufra alguna enfermedad autoinmunitaria, similar a las que se describen a continuación.

1. La **esclerosis múltiple** (**MS**) es una afección inflamatoria que casi siempre afecta a adultos jóvenes, causa daño neurológico grave y a menudo progresivo. La MS se debe al ataque por células inmunitarias y anticuerpos contra la vaina de mielina que rodea los axones de las células nerviosas (pág. 167). Estas vainas forman la sustan-

cia blanca del sistema nervioso central. La desmielinización de los nervios ocasionada por este ataque inmunitario interfiere con la producción de impulsos nerviosos a lo largo de los axones, lo que disminuye la función visual, causa problemas para la coordinación motora y alteraciones en la sensibilidad. Una enfermedad similar a la esclerosis múltiple, la encefalomielitis alérgica experimental, puede inducirse en animales de laboratorio mediante la inyección de proteína básica de mielina, un componente principal de la membrana plasmática de la mielina.

2. La **diabetes dependiente de insulina** (**IDDM**) suele llamarse diabetes de inicio juvenil o diabetes tipo 1 porque tiende a originarse en niños y es resultado de la destrucción autoinmunitaria de las células pancreáticas beta, secretoras de insulina. Las células T autoreactivas median la destrucción de estas células. En la actualidad, los pacientes con diabetes tipo 1 reciben dosis diarias de insulina. Aunque la hormona les permite vivir, estos individuos aún están sometidos a enfermedad degenerativa de los riñones, vasos sanguíneos y retina.
3. La **enfermedad de Graves y la tiroiditis** son anormalidades autoinmunitarias de la tiroides que producen síntomas muy distintos. En la enfermedad de Graves, el blanco del ataque inmunitario es el receptor para hormona estimulante de la tiroides (TSH) en la superficie de las células tiroideas que en condiciones normales se une con la TSH proveniente de la hipófisis. En los sujetos con esta anomalía, los autoanticuerpos se unen con el receptor TSH, lo que causa estimulación prolongada de las células tiroideas y produce hipertiroidismo (aumento de los niveles sanguíneos de hormona tiroidea). La tiroiditis (o tiroiditis de Hashimoto) es consecuencia del ataque inmunitario contra una o más de las proteínas comunes de las células tiroideas, incluida la tiroglobulina. La destrucción resultante de la glándula tiroides da origen al hipotiroidismo (disminución de los niveles sanguíneos de hormona tiroidea).
4. La **artritis reumatoide** afecta a casi 1% de la población y se caracteriza por la destrucción progresiva de las articulaciones por una cascada de respuestas inflamatorias. En una articulación normal, la membrana sinovial que recubre la cavidad sinovial sólo tiene una capa de grosor. En las personas con artritis reumatoide, esta membrana se inflama y engruesa por la infiltración de células inmunitarias autorreactivas y autoanticuerpos en la articulación. Con el tiempo, el cartílago se sustituye por tejido fibroso, lo cual causa inmovilización de la articulación.
5. El **lupus eritematoso sistémico** (**SLE**) deriva su nombre ("lobo rojo") del exantema que aparece en las mejillas durante las etapas iniciales de evolución. A diferencia de las otras enfermedades autoinmunitarias descritas antes, el SLE pocas veces se limita a un órgano particular, sino que ataca tejidos de todo el cuerpo, incluido el sistema nervioso central, riñones y corazón. El suero de los pacientes con SLE contiene anticuerpos dirigidos contra varios componentes que se encuentran en el núcleo de las células, incluidas pequeñas ribonucleoproteínas nucleares y proteínas de los centrómeros de los cromosomas, y contra el DNA de cadena doble, lo que es más notable aún. Estudios recientes sugieren que se produce autoinmunidad cuando TLR que normalmente reconocen DNA y RNA microbianos (pág. 695) se unen por error a macromoléculas informativas del propio organismo. La incidencia de SLE es muy alta entre las mujeres en edad reproductiva, lo que sugiere cierto papel de las hormonas femeninas en el inicio de la enfermedad.

FIGURA 1 Exantema en mariposa, un síntoma temprano común del lupus eritematoso sistémico. (Cortesía de Lupus Foundation of America, Inc.)

No todos los miembros de la población tienen la misma susceptibilidad para desarrollar alguna de estas anormalidades autoinmunitarias. La mayoría de estos trastornos son mucho más frecuentes en ciertas familias que en la población general, lo que indica un fuerte componente genético en su desarrollo. Aunque se ha demostrado que distintos genes incrementan la susceptibilidad a las enfermedades autoinmunitarias, los que codifican los polipéptidos MHC clase II son los que tienen un vínculo más notorio. Por ejemplo, las personas que heredan ciertos alelos del locus MHC son muy susceptibles a desarrollar diabetes tipo 1 (IDDM). Se cree que las células que tienen moléculas MHC codificadas por el alelo susceptible pueden unirse con algún péptido particular que estimula la formación de autoanticuerpos contra las células beta, secretoras de insulina del páncreas.

Es probable que sea necesaria la presencia de alelos de alto riesgo para que un individuo desarrolle ciertas enfermedades autoinmunitarias, pero no es el único factor contribuyente. Los estudios en gemelos idénticos indican que si uno de los gemelos desarrolla una enfermedad autoinmunitaria, la probabilidad de que el otro gemelo la presente también varía entre 25 y 75%, no 100% como se esperaría si la genética fuera el único factor contribuyente. Los estudios de este tipo demuestran que los factores ambientales también participan. La importancia de los patógenos en el desarrollo de los trastornos autoinmunitarios se demostró por primera vez en estudios de fiebre reumática, un trastorno que puede desarrollarse en niños varias semanas después de una infección estreptocócica de la faringe (faringitis estreptocócica). La fiebre reumática se desarrolla cuando el tejido cardiaco sufre el ataque de anticuerpos que se produjeron como respuesta al estreptococo. El tejido cardiaco se vuelve el blanco de estos anticuerpos por un fenómeno llamado "mimetismo molecular". En este caso, uno de los componentes de la pared celular bacteriana es similar a una glucoproteína en la superficie de las células que recubren las válvulas cardiacas. Como resultado, los anticuerpos producidos como respuesta a la infección bacteriana establecen una reacción cruzada con el tejido cardiaco. En casos de esclerosis múltiple, se observa que las infecciones por virus respiratorios o intestinales pueden activar las células T autorreactivas y desencadenar recaídas en personas que habían estado en remisión. De hecho, algunos investigadores creen que la infección vírica es una causa subyacente de la esclerosis múltiple. Esta idea la respaldan informes de "epidemias de esclerosis múltiple". Los estudios con animales también indicaron la importancia de los patógenos. Por ejemplo, los ratones que carecen de un gen para la citocina IL-2 (ratones con eliminación de IL-2) desarrollan una enfermedad intestinal inflamatoria parecida a la colitis ulcerosa humana. Este problema sólo se desarrolla en estos animales de laboratorio si se exponen a agentes infecciosos del ambiente normal; si se crían en condiciones libres de gérmenes permanecen exentos de la enfermedad.

El gran progreso que se ha hecho en los últimos 20 años en el conocimiento de las bases celulares y moleculares de la inmunidad derivó en nuevos tratamientos prometedores para varias enfermedades autoinmunitarias. Estos tratamientos se han probado en modelos animales (p. ej., animales en los que pueden inducirse afecciones similares a las de los seres humanos) y hay pruebas clínicas en desarrollo. Existen varias terapias distintas bajo prueba o en uso:

- Tratamiento con agentes inmunosupresores, como la ciclosporina A que bloquea la reacción inmunitaria. Como estos fármacos son inespecíficos, inhiben todos los tipos de respuestas inmunitarias, por lo que dejan al paciente muy susceptible a infecciones peligrosas.
- Inducción del regreso al estado tolerante para que el cuerpo ya no produzca autoanticuerpos y células T autorreactivas. Una manera de inducir tolerancia a antígenos específicos consiste en administrar ligandos peptídicos alterados (APL). Se cree que éstos se unen con los TCR en forma imperfecta, lo que bloquea la activación de las células T y disminuye la secreción de citocinas inflamatorias (p. ej., TNF-α e IFN-γ). Un fármaco de este tipo (acetato de glatiramer) consiste en una mezcla de péptidos sintéticos cuya estructura recuerda la propia de la proteína básica mielina. El acetato de glatiramer reduce la frecuencia de recaídas en pacientes con esclerosis múltiple pero no detiene el avance de la enfermedad, y puede inducir graves efectos secundarios alérgicos. Otra manera de lograr esta meta es administrar una versión modificada de la proteína CTLA4, que se une a la proteína coestimuladora B7 en la superficie de las APC e inhibe la capacidad de estas células de activar células T autorreactivas. Abatacept, que actúa de esta manera, ha sido aprobado para pacientes con artritis reumatoide.
- Interferencia con la respuesta autoinmunitaria mediante la administración de anticuerpos. Hay un anticuerpo dirigido contra la proteína CD3 presente en la superficie de las células T (fig. 17-18) que está en pruebas para el tratamiento de la diabetes tipo I. El anticuerpo desactiva o destruye las células que atacan a las células pancreáticas secretoras de insulina, pero pueden ocasionar una deficiencia inmunitaria acentuada. Los anticuerpos contra la citocina TNF-α (p. ej., infliximab y adalimumab) se aprobaron para el tratamiento de la artritis reumatoide y pueden tener efectos curativos espectaculares en algunos sujetos. También hay informes de pruebas prometedoras con rituximab, un anticuerpo monoclonal empleado en el tratamiento del linfoma de células B (pág. 683) que produce agotamiento de las células B. Lo que resulta sorprendente es que la deficiencia de células B no parece limitar la capacidad de los pacientes para establecer reacciones inmunitarias contra agentes infecciosos. El tratamiento más eficaz desarrollado a la fecha para la esclerosis múltiple es un anticuerpo (natalizumab) dirigido contra la subunidad integrina α_4 presente en la superficie de linfocitos T activados. El objetivo es impedir que estas células crucen la barrera hematoencefálica (pág. 265) y ataquen las vainas de mielina del sistema nervioso central de los pacientes con MS. Con cualquier tipo de inmunoterapia siempre existe la preocupación de que el tratamiento interfiera la capacidad del organismo de combatir infecciones. Esta preocupación salió a la luz cuando natalizumab se retiró temporalmente del mercado en 2005 luego de que tres pacientes desarrollaron una grave infección vírica del cerebro.

  La administración de anticuerpos que interfieren en las funciones reguladoras de la inmunidad debe abordarse con gran cautela. Este punto se hizo muy patente en 2006 durante un desastroso ensayo de fase I de un anticuerpo monoclonal llamado TNG1412 dirigido contra una proteína de superficie celular conocida como CD28. El anticuerpo estaba diseñado para activar células T reguladoras en un intento de amortiguar las inmunoreacciones del organismo (pág. 703). A seis voluntarios sanos se les inyectó el anticuerpo, y los seis experimentaron rápida y grave falla orgánica múltiple como resultado de la liberación sistémica de citocinas proinflamatorias. El fármaco se había probado a dosis mucho mayores en monos de laboratorio sin que presentaran efectos secundarios notables.
- Bloqueo del efecto de las citocinas inflamatorias con la administración de citocinas supresoras. Por ejemplo, IL-4 parece alentadora en el tratamiento de la diabetes dependiente de insulina y el IFN-β1a se aprobó para el tratamiento de la esclerosis múltiple.
- Trasplante de células madre hematopoyéticas (pág. 18) del paciente mismo (un autotrasplante) o un donante altamente compatible (un alotrasplante). Debido a que este procedimiento tiene el potencial de causar complicaciones que ponen en peligro la vida, debe limitarse a aquellos pacientes con enfermedad autoinmunitaria grave y debilitante. Sin embargo, a diferencia de los fármacos antes descritos, los receptores de trasplante comienzan el resto de su vida con un sistema inmunitario en gran medida "nuevo" y por tanto con la posibilidad de curarse completamente de su enfermedad.

VÍAS EXPERIMENTALES

El papel del complejo mayor de histocompatibilidad en la presentación de antígenos

En 1973, Hugh McDevitt y sus colegas de la *Scripps Foundation* en La Jolla, California, y de la *Stanford University* demostraron que la susceptibilidad de los ratones a un patógeno particular depende del alelo presente en uno de los loci del MHC.[1] Encontraron que el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) causa una infección cerebral letal en los ratones que son homocigotos o heterocigotos para el alelo H-2^q, pero no infecciones en los ratones homocigotos para el alelo H-2^k en este locus.

Estos hallazgos condujeron a Rolf Zinkernagel y Peter Doherty de la *Australian National University* a examinar el papel de los linfocitos T citotóxicos (CTL) en el desarrollo de esta enfermedad. Zinkernagel y Doherty planearon experimentos para relacionar el nivel de actividad de los CTL con la gravedad de la enfermedad en ratones con distintos genotipos de MHC (o haplotipos, como se los denomina). Se vigiló la actividad de los linfocitos T citotóxicos con el protocolo experimental siguiente. Se cultivaron monocapas de fibroblastos (células L) de un ratón y luego se infectaron con el virus LCM. A continuación, a los fibroblastos infectados se les superpuso una preparación de células esplénicas de un ratón que se habían infectado con el virus LCM siete días antes. La espera de siete días dio tiempo al sistema inmunitario del animal para generar CTL contra las células infectadas con el virus. Los CTL se concentraron en el bazo del animal infectado. Para vigilar la efectividad del ataque de los CTL en las células L cultivadas, primero las células L se marcaron con un radioisótopo de cromo (^{51}Cr). El ^{51}Cr se usa como marcador de la viabilidad celular: mientras la célula siga viva, el radioisótopo permanece dentro de la célula. En caso que una

Cuadro 1 Actividad citotóxica de células esplénicas de varias cepas de ratones inyectados siete días antes con virus LCM en monocapas de células L de ratón $C_3H(H\text{-}2^k)$ infectadas con LCM o normales

Exp.	Cepa de ratón	Tipo H-2	% de ^{51}CR liberado: Infectadas	% de ^{51}CR liberado: Normales
1	CBA/H	*k*	65.1 ± 3.3	17.2 ± 0.7
	Balb/C	*d*	17.9 ± 0.9	17.2 ± 0.6
	CB57B1	*b*	22.7 ± 1.4	19.8 ± 0.9
	CBA/H × C57B1	*k/b*	56.1 ± 0.5	16.7 ± 0.3
	CB57Bl × Balb/C	*b/d*	24.8 ± 2.4	19.8 ± 0.9
	nu/+ o +/+		42.8 ± 2.0	21.9 ± 0.7
	nu/nu		23.3 ± 0.6	20.0 ± 1.4
2	CBA/H	*k*	85.5 ± 3.1	20.9 ± 1.2
	AKR	*k*	71.2 ± 1.6	18.6 ± 1.2
	DBA/2	*d*	24.5 ± 1.2	21.7 ± 1.7
3	CBA/H	*k*	77.9 ± 2.7	25.7 ± 1.3
	C3H/HeJ	*k*	77.8 ± 0.8	24.5 ± 1.5

célula se destruyera por acción de un CTL durante el experimento, el ^{51}Cr se libera al medio.

Zinkernagel y Doherty encontraron que el nivel de actividad de los CTL contra los fibroblastos cultivados (medida por la liberación de ^{51}Cr) dependía de los genotipos relativos de los fibroblastos y las células esplénicas (cuadro 1).[2] Todos los fibroblastos empleados para obtener los datos mostrados en el cuadro 1 se obtuvieron de una cepa endogámica de ratones homocigotos para el alelo $H\text{-}2^k$ en el locus H-2. Cuando se prepararon las células esplénicas de ratones con un alelo $H\text{-}2^k$ (p. ej., cepas de ratones CBA/H, AKR y C3H/HeJ), las células L se destruyeron. Sin embargo, las células esplénicas tomadas de ratones que tenían alelos $H\text{-}2^b$ o $H\text{-}2^d$ en este locus no pudieron destruir a los fibroblastos infectados. (El ^{51}Cr liberado es casi el mismo cuando se emplean fibroblastos no infectados en la prueba, como se muestra en la columna derecha del cuadro 1.)

Fue indispensable demostrar que los resultados no eran peculiares a los ratones que tenían alelos $H\text{-}2^k$. Para hacer esta comprobación, Zinkernagel y Doherty probaron células esplénicas activadas con LCMV de ratones $H\text{-}2^b$ contra varios tipos de células infectadas. De nueva cuenta, los CTL sólo pudieron destruir a las células infectadas con el mismo genotipo H-2, en este caso $H\text{-}2^b$. Estos estudios proporcionaron la primera evidencia de que las moléculas MHC en la superficie de una célula infectada limitan sus interacciones con las células T. Se dice que la función de la célula T está *restringida por MHC*.

Estos y otros experimentos durante el decenio de 1970 llevaron a formular preguntas sobre el papel de las proteínas MHC en la función de las células inmunitarias. Mientras tanto, otra línea de investigación se enfocó en el mecanismo por el cual las células T se estimulan por antígenos particulares. Los estudios indicaron que las células T responden al antígeno unido con la superficie de otras células. Se presumió que el antígeno presentado estaba tan sólo unido a la superficie de la célula presentadora de antígeno (APC) proveniente del medio extracelular. A mediados del decenio de 1970 y principios del de 1980, los estudios de Alan Rosenthal de los NIH, de Emil Unanue de la *Harvard University* y de otros investigadores demostraron que la APC tiene que interiorizar el antígeno y someterlo a algún tipo de procesamiento para que pueda estimular la proliferación de células T. La mayoría de estos estudios se realizaron en cultivos celulares con células T activadas por macrófagos que se habían expuesto a bacterias, virus u otro material ajeno.

Una de las maneras para distinguir entre un antígeno que tan sólo está unido con la superficie de la APC y el antígeno que se procesó mediante actividades metabólicas consiste en comparar los fenómenos que pueden ocurrir a bajas temperaturas (p. ej., 4°C) en las que se bloquean los procesos metabólicos con los fenómenos que ocurren en temperaturas corporales normales. En uno de estos experimentos iniciales se incubaron macrófagos con antígeno durante una hora a 4 o 37°C y luego se probó su capacidad para estimular a las células T preparadas a partir de ganglios linfáticos.[3] En presencia de concentraciones bajas de antígeno, los macrófagos tenían una efectividad casi 10 veces mayor para estimular a las células T a 37°C respecto de 4°C, lo que sugiere que el procesamiento del antígeno requiere actividades metabólicas activas. El tratamiento de las células con azida de sodio, un inhibidor de la oxidasa de citocromo, también inhibió la aparición del antígeno en la superficie de las células T, lo que indica que la presentación de antígeno requiere energía metabólica.[4]

Los experimentos posteriores realizados por Kirk Ziegler y Emil Unanue suministraron evidencia de que se producía un secuestro de los antígenos extracelulares, los cuales se llevaban al interior del macrófago por endocitosis para liberarlos en el compartimiento lisosómico de la célula.[5] Una forma de averiguar si los lisosomas participan en un

Cuadro 2 Inhibición de la presentación de antígeno con NH_4Cl y cloroquina

Prueba	Control (%)	NH_4Cl (10 mM) Observado (%)	NH_4Cl (10 mM) Inhibición (%)	Cloroquina (0.1 mM) Observado (%)	Cloroquina (0.1 mM) Inhibición (%)
Captación del antígeno	15 ± 1	13 ± 2	13	15 ± 2	0
Ingestión del antígeno	66 ± 2	63 ± 2	5	67 ± 6	–2
Catabolismo del antígeno	29 ± 4	13 ± 3	55	14 ± 6	52
Unión célula T-macrófago					
antes de la manipulación del antígeno	70 ± 7	26 ± 8	63	30 ± 8	57
después de la manipulación del antígeno	84 ± 8	70 ± 11	17	60 ± 10	24

Fuente: H. K. Ziegler y E.R. Unanue. *Proc Nat'l Acad Sci USA* 79:176, 1982.

proceso particular consiste en tratar a las células con sustancias, como el cloruro de amonio o cloroquina, que interrumpen la actividad enzimática lisosómica. Estos dos agentes elevan el pH del compartimiento lisosómico, lo cual desactiva a las hidrolasas ácidas (pág. 308). El cuadro 2 muestra los efectos de estos tratamientos en el procesamiento y presentación del antígeno derivado de la bacteria *Listeria monocytogenes*. En el cuadro puede verse que ninguna de estas sustancias afectó la captación (endocitosis) del antígeno, sino que ambas inhibieron el procesamiento del antígeno y su capacidad para estimular la unión de las células T con el macrófago. Estos datos fueron de los primeros en sugerir que la fragmentación de los antígenos extracelulares por las proteasas lisosómicas puede ser un paso esencial en la preparación de los antígenos extracelulares antes de la presentación.

Otros estudios también refirieron a las moléculas MHC en la interacción entre las APC y las células T. En una serie de experimentos, Ziegler y Unanue trataron a los macrófagos con anticuerpos dirigidos contra las proteínas MHC codificadas por el locus H-2. Encontraron que estos anticuerpos no tenían efecto en la captación o catabolismo del antígeno,[6] pero impedían que los macrófagos interactuaran con las células T.[7] La inhibición de la unión de las células T con los macrófagos se producía aun cuando los macrófagos se expusieran a los anticuerpos antes de agregar el antígeno.

La evidencia de estos y muchos otros estudios indicó que la interacción entre una célula T y un macrófago dependía del reconocimiento de dos componentes en la superficie de la célula presentadora de antígeno: el fragmento de antígeno que se mostraba y una molécula MHC. Sin embargo, no había una imagen clara de la forma en que se relacionaban el fragmento de antígeno y la molécula MHC. Se consideraron probables dos modelos de reconocimiento de antígeno. De acuerdo con uno, las células T tienen dos receptores distintos, uno para el antígeno y otro para la proteína MHC. De acuerdo con el otro, un solo receptor de la célula T reconoce la proteína MHC y el péptido antigénico en la superficie de la APC al mismo tiempo. El consenso comenzó a inclinarse en favor del modelo de un solo receptor cuando la evidencia empezó a señalar una relación física entre las proteínas MHC y los antígenos presentados. Por ejemplo, en un estudio se demostró que el antígeno que habían procesado las células T podía aislarse como un complejo con proteínas MHC.[8] En este experimento, las células T cultivadas tomadas de ratones H-2^k se incubaron durante 40 min con un antígeno marcado con radiactividad. Después del periodo de incubación, se preparó el antígeno procesado a partir de las células y se pasó por una columna que contenía cuentas cubiertas con anticuerpos dirigidos contra las proteínas MHC. Cuando las cuentas se cubrieron con anticuerpos dirigidos contra la proteína H-2^k, una molécula MHC presente en las células T, se adhirieron grandes cantidades de antígeno radiactivo a las cuentas, lo que indicó la relación del antígeno procesado con la proteína MHC. Si las cuentas se cubrían con anticuerpos contra la proteína H-2^b, una proteína MHC ausente de las células T, la columna quedaba con una cantidad relativamente baja de radiactividad.

Después de estos experimentos iniciales, los investigadores desviaron su atención hacia la estructura atómica de las moléculas que

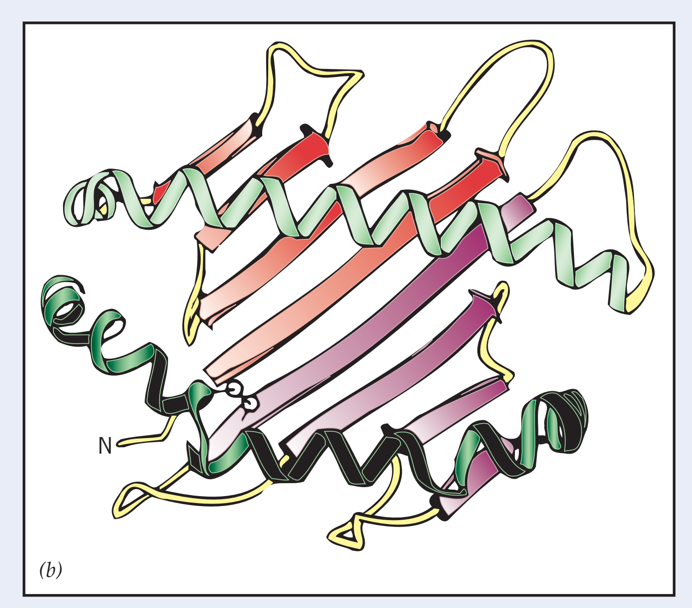


FIGURA 1 *a*) Representación esquemática de una molécula MHC clase I, en este caso la proteína humana HLA-A2. La molécula consiste en dos subunidades: una cadena pesada formada por tres dominios (α_1, α_2 y α_3) y una cadena β_2m. La porción de la cadena pesada que cruza la membrana se conectaría con el polipéptido en el sitio marcado C (por la terminación C de la porción restante). Los enlaces disulfuro se indican como dos esferas conectadas. La hendidura para unión con el péptido se muestra en la parte superior del dibujo, entre los segmentos helicoidales alfa de los dominios α_1 y α_2 de la cadena pesada. *b*) Representación esquemática del saco para unión con péptido de la proteína MHC vista desde la parte superior de la molécula. La parte inferior del saco está recubierta por hojas beta (flechas naranja-púrpura) y las paredes por las hélices alfa (verde). El dominio α_1 se muestra en naranja y verde claro; el dominio α_2 aparece en púrpura y verde oscuro. (Reimpresa con autorización de P. J. Bjorkman, et al. Nature 329:508, 509, 1987; © 1987, Macmillan Magazines Ltd.)

intervenían en las interacciones de la célula T. En lugar de utilizar moléculas MHC clase II en las superficies de los macrófagos, los estudios estructurales habían examinado moléculas MHC clase I del tipo que se encuentra en la superficie de las células infectadas con virus. El primer retrato tridimensional de una molécula MHC se publicó en 1987 y se basó en estudios cristalográficos con rayos X realizados por Don Wiley y sus colegas de la *Harvard University*.[9] Los sucesos que llevaron a este descubrimiento se exponen en la referencia 10. Las moléculas MHC clase I consisten en: a) una cadena pesada con tres dominios extracelulares (α_1, α_2 y α_3) y un solo segmento que cruza la membrana y b) un polipéptido invariable β_2m (véase fig. 17-21). Wiley y sus colegas examinaron la estructura de la porción extracelular (soluble) de la molécula MHC (α_1, α_2, α_3 y β_2m) después de retirar el ancla transmembranosa. La figura 1*a* muestra un modelo de la estructura observada, con la porción externa (con el antígeno) de la proteína formada por los dominios α_1 y α_2. En este modelo puede verse que las superficies internas de estos dominios forman las paredes de una hendidura profunda de unos 25 Å de largo y 10 Å de ancho. Ésta es la hendidura que actúa como sitio de unión para los péptidos producidos por el procesamiento de antígenos en el citoplasma. Como se muestra en la figura 1*b*, los lados del saco de unión con antígeno están recubiertos por hélices alfa de los dominios α_1 y α_2, y el fondo del saco está recubierto con la hoja beta que se extiende desde estos mismos dominios a través de la línea media. Se cree que las hélices forman paredes laterales relativamente flexibles que permiten que los péptidos con secuencia diferente se unan en la hendidura.

Los estudios cristalográficos con rayos X subsiguientes describieron la manera en que se sitúan los péptidos dentro del saco para unión con MHC. En uno de estos estudios se identificó la disposición espacial de varios péptidos procesados en forma natural que se sitúan dentro del saco para unión de antígenos de una sola molécula MHC clase I (HLA-B27).[11] Las columnas de todos los péptidos unidos con HLA-B27 comparten una sola conformación extendida que recorre toda la longitud de la hendidura de unión. Las terminaciones N y C de los péptidos tienen una posición precisa mantenida por numerosos enlaces de hidrógeno en ambos extremos de la hendidura. Los enlaces de hidrógeno unen el péptido con varios de los residuos conservados en la molécula MHC que son parte de ambos lados y el fondo de la hendidura de unión.

En otro estudio clave, Ian Wilson y sus colegas del *Scripps Research Institute* en La Jolla, California, informaron sobre la estructura cristalográfica por rayos X de una proteína MHC clase I de ratón en complejo con dos péptidos de longitud diferente.[12,13] La estructura general de la proteína MHC de ratón es similar a la de la proteína MHC humana mostrada en la figura 1*a*. En ambos casos, los péptidos están unidos en su conformación extendida en la profundidad de la hendidura de unión de la molécula MHC (fig. 2). Esta conformación extendida permite muchas interacciones entre las cadenas colaterales de la molécula MHC y la columna del péptido unido. Como MHC interactúa sobre todo con la columna del péptido en lugar de sus cadenas laterales, hay muy pocas restricciones en los residuos de aminoácidos particulares que pueden encontrarse en varios sitios del saco de unión. Como resultado, cada molécula MHC puede unirse con un conjunto diverso de péptidos antigénicos.

Un complejo MHC-péptido que sobresale de la superficie de una célula infectada sólo representa la mitad del reconocimiento inmunitario; la otra mitad está representada por el receptor de la célula T (TCR) que sobresale de la superficie de la célula T citotóxica. Durante más de un decenio ha sido evidente que un TCR puede reconocer de alguna manera MHC y su péptido contenido, pero la manera en que esto ocurre permanecía incierta para los investigadores por las dificultades para preparar cristales de proteína del TCR adecuados para la cristalografía por rayos X. Al final, estas dificultades se resolvieron, y en 1996 Wiley y los Laboratorios Wilson publicaron documentos en los que presentaban un retrato tridimensional de la interacción entre un péptido-MHC y TCR.[14,15]

La estructura general del complejo formado entre las dos proteínas se muestra en la figura 3, en la que las columnas de los polipéptidos se presentan como tubos. La fotografía que inicia el capítulo en la página 693 ofrece un modelo espacial de un complejo similar.

La estructura que se muestra en la figura 3 presenta las porciones de las proteínas que se proyectan entre un CTL y una célula hospedadora infectada por un virus. La mitad inferior de la imagen muestra la estructura y orientación de la molécula MHC clase I con un antígeno peptídico extendido (amarillo-verde) incrustado en el saco de unión de la proteína. La mitad superior de la imagen muestra la estructura y orientación del TCR. Como se indica en la figura 17-18*b*, un TCR consiste en cadenas polipeptídicas alfa y beta, cada una formada por una porción variable (V) y una constante (C). Al igual que las inmunoglobulinas (fig. 17-13), la porción variable de cada subunidad del TCR contiene regiones que son muy variables (hipervariables). Las regiones hipervariables forman las asas sobresalientes (mostradas como segmentos coloreados de los dos polipéptidos TCR en la figura 3) que se ajustan sobre el extremo exterior del complejo MHC-péptido. Las regiones hipervariables se conocen como *regiones determinantes de la complementariedad* o *CDR* porque establecen las propiedades de unión del TCR. Las CDR del TCR interactúan con las hélices alfa de los dominios α_1 y α_2 del MHC, así como los residuos expuestos del péptido unido. Las CDR centrales del TCR, que tienen la mayor variabilidad de secuencia, interactúan sobre todo con el péptido unido situado en el centro, mientras que las CDR externas, que tienen secuencia menos variable, lo hacen más con las hélices alfa del MHC.[16] A causa de estas interacciones, el TCR cumple sus dos "responsabilidades" de reconocimiento: reconoce al péptido unido como antígeno ajeno y a la

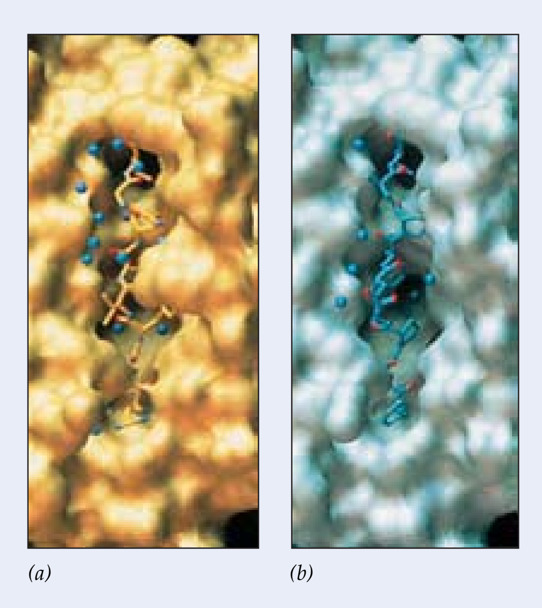

(a) *(b)*

FIGURA 2 Modelos tridimensionales de un péptido (mostrado como estructura con esferas y barras) unido dentro del saco para unión con antígeno de una proteína MHC clase I de ratón (H-2K^b). El péptido en *a* posee ocho residuos de aminoácidos; el péptido en *b* está formado por nueve residuos. Los péptidos se ven incrustados en la profundidad de la hendidura de unión de MHC. (Reimpresa con autorización de Masazumi Matsumura, Daved H. Fremont, Per A. Peterson y Ian A. Wilson, Science 257:932, 1992. © 1992, American Association for the Advancement of Science.)

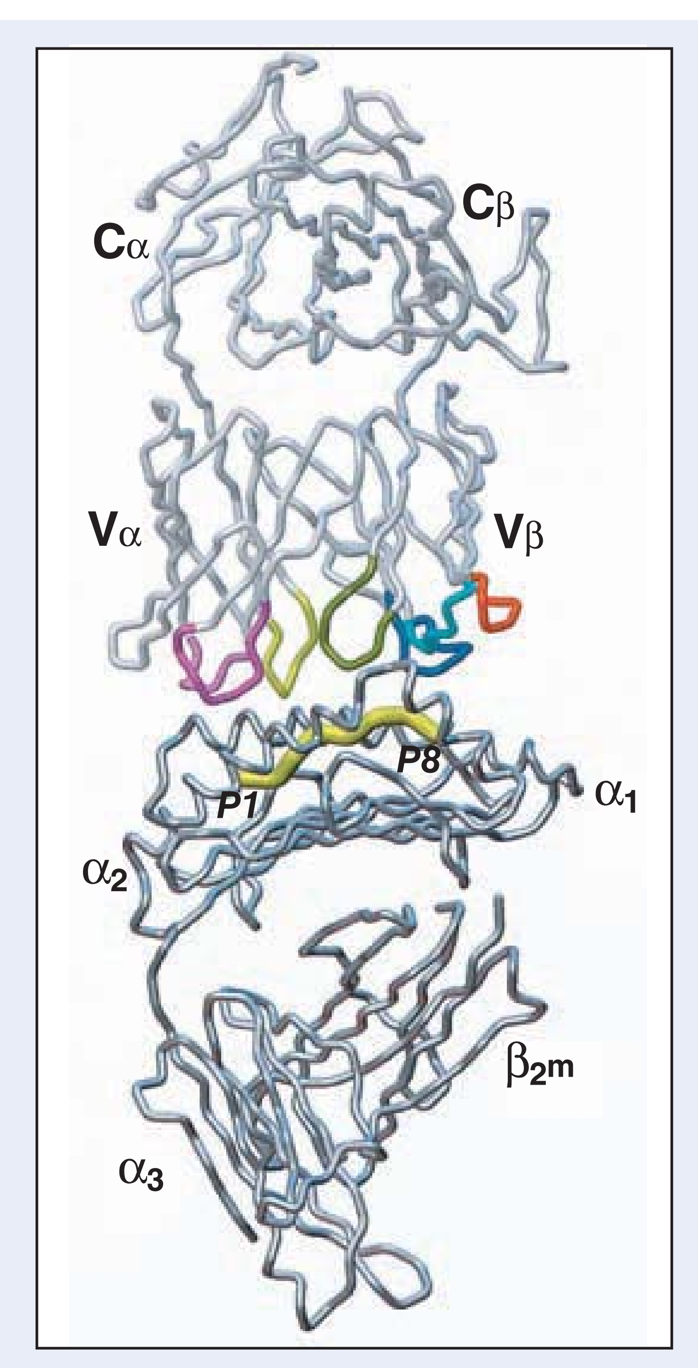


FIGURA 3 Representación de la interacción entre un complejo MHC-péptido (en la parte inferior) y un TCR (en la parte superior). Las regiones hipervariables (CDR) del TCR se muestran como asas coloreadas que forman la interfase entre las dos proteínas. El péptido unido (P1-P8) se muestra en amarillo-verde situado dentro de la hendidura de unión de la molécula MHC clase I. Las columnas de los péptidos se representan como tubos. (Reimpresa con autorización de K. Christopher Garcia et al., por cortesía de Ian Wilson, Science 274:217, 1996; © 1996, American Association for the Advancement of Science.)

MHC como proteína propia. (Se puede encontrar información sobre estudios recientes de las estructuras adicionales TCR-péptido-MHC en las referencias 17 a 19.)

Referencias

1. Oldstone, M. B. A., et al. 1973. Histocompatibility-linked genetic control of disease susceptibility. *J. Exp. Med.* 137:1201–1212.
2. Zinkernagel, R. M. & Doherty, P. C. 1974. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248: 701–702.
3. Waldron, J. A., et al. 1974. Antigen-induced proliferation of guinea pig lymphocytes in vitro: Functional aspects of antigen handling by macrophages. *J. Immunol.* 112:746–755.
4. Wekerle, H., et al. 1972. Fractionation of antigen reactive cells on a cellular immunoadsorbant. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 69:1620–1624.
5. Ziegler, K. & Unanue, E. R. 1982. Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 79:175–178.
6. Ziegler, K. & Unanue, E. R. 1981. Identification of a macrophage antigen-processing event required for I-region-restricted antigen presentation to T lymphocytes. *J. Immunol.* 127:1869–1875.
7. Ziegler, K. & Unanue, E. R. 1979. The specific binding of Listeria monocytogenes-immune T lymphocytes to macrophages. I. Quantitation and role of H-2 gene products. *J. Exp. Med.* 150:1142–1160.
8. Puri, J. & Lonai, P. 1980. Mechanism of antigen binding by T cells H-2 (I-A)-restricted binding of antigen plus Ia by helper cells. *Eur. J. Immunol.* 10:273–281.
9. Bjorkman, P. J., et al. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506–512.
10. Bjorkman, P. J. 2006. Finding the groove. *Nature Immunol.* 7:787-789.
11. Madden, D. R., et al. 1992. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* 70:1035–1048.
12. Fremont, D. H., et al. 1992. Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-$2K^b$. *Science* 257:919–927.
13. Matsumura, M., et al. 1992. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 257:927–934.
14. Garcia, K. C., et al. 1996. An αβ T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR–MHC complex. *Science* 274:209–219.
15. Garboczi, D. N., et al. 1996. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384:134–140.
16. Wilson, I. A. 1999. Class-conscious TCR? *Science* 286:1867–1868.
17. Hennecke, J. & Wiley, D. C. 2001. T cell receptor–MHC interactions up close. *Cell* 104:1–4.
18. Davis, M. M. 2003. The problem of plain vanilla peptides. *Nature Immunol* 4:649–650.
19. Wilson, I. A. & Stanfield, R. L. 2005. MHC restriction: slip-sliding away. *Nature Immunol.* 6:434-435.

SINOPSIS

Los vertebrados están protegidos de la infección por las reacciones inmunitarias de células que pueden distinguir entre materiales que se "supone" deben estar ahí ("propios") y los que no deben estarlo (ajenos o "no propios"). Las respuestas innatas son rápidas, pero carecen de especificidad, mientras que las reacciones inmunitarias adaptativas son muy específicas, pero requieren un periodo de espera de varios días. Las respuestas innatas las realizan las células fagocíticas que vigilan el cuerpo; éstas son moléculas que se encuentran en la sangre (complemento) y pueden destruir células bacterianas, proteínas antivíricas (interferones) y células destructoras naturales que hacen que las células infectadas se sometan a la apoptosis. Se pueden distinguir dos amplias categorías de inmunidad adaptativa: a) inmunidad humoral (sanguínea), mediada por anticuerpos que producen células derivadas de los linfocitos B (células B) y b) inmunidad mediada por células, a cargo de los linfocitos T (células T). Las células B y T derivan de la misma célula primordial, que también da origen a otros tipos de células sanguíneas (pág. 694).

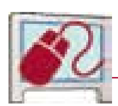
Las células del sistema inmunitario se desarrollan por selección clonal. Durante su desarrollo, cada célula B se compromete con la producción de sólo una especie de molécula de anticuerpo, que al principio se presenta como un receptor de antígeno en la membrana plasmática de la célula. El compromiso de la célula B ocurre en ausencia de antígeno, por lo que todo el repertorio de células productoras de anticuerpos ya está presente antes de la estimulación con un antígeno. Cuando una sustancia extraña aparece en el cuerpo, funciona como antígeno mediante la interacción con las células B que contienen anticuerpos unidos con su membrana, capaces de unirse con esa sustancia. Las actividades de unión con antígeno de la célula B inducen su proliferación y forman un clon de células que se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos. De esta manera, el antígeno selecciona las células B que producen anticuerpos capaces de interactuar con él. Algunas de las células B seleccionadas por el antígeno permanecen como células de memoria no diferenciadas que responden con rapidez si el antígeno ingresa de nueva cuenta. Las células B cuyos receptores de antígeno son capaces de reaccionar con los propios tejidos del cuerpo se desactivan o se eliminan, lo que hace que el cuerpo desarrolle tolerancia inmunitaria hacia sí mismo (pág. 697).

Los linfocitos T reconocen a los antígenos mediante sus receptores de células T (TCR). Las células T pueden dividirse en dos subclases distintas: células T colaboradoras (células T_H) que activan a células B y linfocitos T citotóxicos (CTL) que destruyen células ajenas o infectadas, y las células T reguladoras (células T_{Reg}), que por lo general suprimen otras células T. A diferencia de las células B que se activan por antígenos solubles intactos, las células T se activan por fragmentos de antígenos que se presentan en las superficies de otras células, las células presentadoras de antígeno (APC). Aunque cualquier célula infectada puede activar un CTL, sólo las APC profesionales, como los macrófagos y las células dendríticas, que funcionan en la ingestión y procesamiento de antígenos, pueden activar a las células T_H. Las células T citotóxicas aniquilan a las células blanco mediante la secreción de proteínas que hacen permeable la membrana de la célula blanco e inducen la apoptosis de ésta (pág. 701).

Los anticuerpos son proteínas globulares llamadas inmunoglobulinas (Ig) que se forman con dos tipos de cadenas polipeptídicas: cadenas pesadas y ligeras. Los anticuerpos se dividen en varias clases (IgA, IgG, IgD, IgE e IgM), según sea su cadena pesada. Las cadenas pesadas y ligeras consisten en: a) regiones constantes (C), que son aquellas cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en todas las cadenas pesadas y ligeras de una clase determinada, y b) regiones variables (V), que son aquellas cuya secuencia varía de una especie de anticuerpo a otra. Las diferentes clases de anticuerpos aparecen en distintos momentos después de la exposición a un antígeno y tienen diversas funciones biológicas. La IgG es la forma predominante de anticuerpo en la sangre. Cada molécula de IgG con forma de Y contiene dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Los sitios para combinación con antígeno se forman por la relación de la región V de una cadena ligera con la región V de una cadena pesada. En las regiones V se incluyen las regiones hipervariables que constituyen las paredes del sitio de combinación con antígeno (pág. 703).

Los receptores para antígenos de las células B y T están codificados por genes producidos mediante recombinación del DNA. Cada región variable de una cadena ligera de Ig se forma de dos segmentos de DNA (un segmento V y uno J) que se unen, mientras que cada región variable de una cadena pesada de Ig se compone de tres segmentos unidos (segmentos V, J y D). La variabilidad es resultado de la unión de diferentes genes V con distintos genes J en diferentes células productoras de anticuerpos. Se logra una variabilidad aún mayor por la inserción enzimática de nucleótidos y la variación en el sitio de unión V-J. Se estima que un individuo puede sintetizar más de 2 000 especies distintas de cadenas ligeras kappa y 100 000 especies de cadenas pesadas, las cuales pueden combinarse al azar para formar más de 200 millones de anticuerpos. Se obtiene más diversidad aun en las células productoras de anticuerpos mediante la hipermutación somática en la que los genes V recombinados experimentan un ritmo de mutación mucho mayor al del resto del genoma (pág. 706).

Las APC captan antígenos, los fragmentan en péptidos cortos y los combinan con proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para presentarlos a las células T. Las proteínas del MHC pueden subdividirse en dos clases: moléculas de clases I y II. Las moléculas MHC de clase I presentan sobre todo péptidos derivados de proteínas citosólicas endógenas, incluidas las derivadas de un virus infectante. Casi todas las células del cuerpo pueden presentar péptidos mediante las moléculas MHC clase I a los linfocitos T citotóxicos. Si el TCR del CTL reconoce un péptido ajeno presentado por una célula, CTL se activa para destruir a la célula blanco. Las APC profesionales, que incluyen a los macrófagos y células dendríticas, presentan péptidos combinados con las moléculas MHC clase II. Los TCR de la superficie de las células T_H reconocen los complejos MHC-péptido de las células presentadoras de antígeno. Las células colaboradoras que se activan por antígenos presentados por una APC se relacionan luego con las células B y las activan. Los receptores de antígeno de estas células (BCR, consistentes en inmunoglobulinas) reconocen el mismo antígeno. Las células T colaboradoras estimulan a las células B mediante interacción directa y por secreción de citocinas. La activación de una célula T por un TCR conduce a la estimulación de proteintirosincinasas dentro de la célula T, lo que a su vez conduce a la activación de varias vías de señalización, incluida la activación de Ras y la cascada de cinasa de MAP, así como la activación de la fosfolipasa C (pág. 709).



SITIO EN INTERNET www.wiley.com/college/karp

Las animaciones y los videos indicados en este capítulo pueden visitarse en el sitio de Cell and Molecular Biology de Karp en Internet. También hallará todas las respuestas a las preguntas analíticas recién planteadas, autoexámenes que le ayudarán a prepararse para los exámenes, y vínculos con fascinantes recursos. La sección lecturas adicionales que sigue se amplía en el sitio en Internet.

LECTURAS ADICIONALES

Las siguientes son revisiones exclusivas de inmunología:
Advances in Immunology
Annual Review of Immunology
Critical Reviews in Immunology
Current Opinion in Immunology
Immunological Reviews
Nature Reviews Immunology
Trends in Immunology

Abbas, A. K., et al. 2003. *Cellular and Molecular Immunology.* 5th ed., Saunders.

Akira, S. & Takeda, K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature Revs. Imm.* 4:499–511.

Chen, I., et al. 2006. Reviews on pathogens and the host immune response. *Cell* 124:#4.

Garcia-Sastre, A. & Biron, C. A. 2006. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in détente. *Science* 312:879–882.

Germain, R. N. 2004. An innately interesting decade of research in immunology. *Nature Med.* 10:1307–1320.

Goodnow, C. C., et al. 2005. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435:590–597.

Goodnow, C. C. 2006. Discriminating microbe from self suffers a double Toll. *Science* 312:1606–1608.

Harnett, M. M. 2006. B cells spread and gather. *Science* 312:709–710.

Hoffmann, J. A. 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426:33–38.

Hogquist, K. A., et. al. 2005. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nature Revs. Imm.* 5:772–783.

Janeway, C. A., et al. 2004. *Immunobiology*, 6th ed. Garland.

Klotman, M. E. & Chang, T. L. 2006. Defensins in innate antiviral immunity. *Nature Revs. Immunol.* 6:447–456.

Krogsgaard, M. & Davis, M. M. 2005. How T cells "see" antigen. *Nature Immunol.* 6:239–245.

Nussenzweig, M. C. & Alt, F. W. 2004. Antibody diversity: one enzyme to rule them all. *Nature Med.* 10:1304–1305.

O'Garra, A. & Vieira, P. 2004. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nature Med.* 10:801–805.

O'Neill, L. A. J. 2005. Immunity's early-warning system. *Sci. Amer.* pp. 38–45. Jan.

Rioux, J. D., et al. 2005. Nature Insight: reviews on autoimmunity. *Nature* 435:584–627.

Schatz, D. G. & Baltimore, D. 2004. Uncovering the V(D)J recombinase. *Cell* S116:S103–S106.

Silverstein, A. M. 2002. The clonal selection theory: what it really is and why modern challenges are misplaced. *Nature Immunol.* 3:793–796.

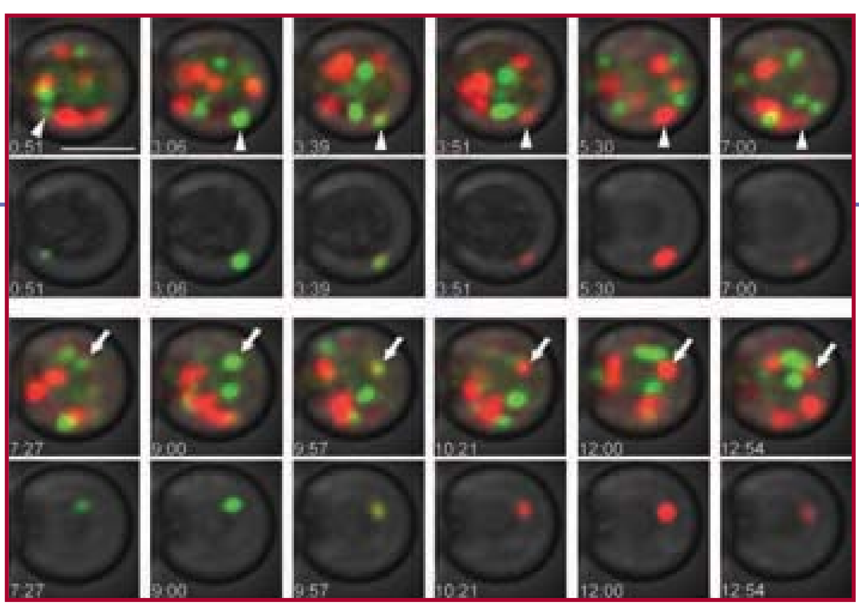
Steinman, L. 2004. Immune therapy for autoimmune disease. *Science* 305:212–216.

Tonegawa, S. 2004. That great time in Basel. *Cell* S116: S99–S101.

Wickelgren, I. 2004. Policing the immune system. *Science* 306: 596–599.

Wickelgren, I. 2006. Targeting the Tolls. *Science* 312:184–187.

CAPÍTULO 18



Técnicas en biología celular y molecular

A causa del tamaño tan pequeño del tema de estudio, la biología celular y molecular depende más del desarrollo de nuevos instrumentos y tecnologías que cualquier otra rama de la biología. Por consiguiente, es difícil aprender acerca de la biología celular y molecular sin aprender también respecto a la tecnología que se requiere para reunir datos. En este capítulo se revisan los métodos que se emplean más a menudo en este campo sin profundizar mucho en los detalles y variaciones que se usan. Los objetivos de este capítulo son: describir las formas en que se utilizan las diversas técnicas y presentar ejemplos de los tipos de información que pueden obtenerse mediante estas técnicas. Se comienza con el instrumento que permitió a los biólogos descubrir la existencia de células, con lo que se establece un punto de partida para toda la información que se presenta en este libro. ●

Uso de la fluorescencia de doble marca para seguir los acontecimientos dinámicos dentro de organelos celulares. Las cisternas de Golgi de una célula de levadura en gemación no se organizan en pilas bien definidas como en la mayoría de las células eucariotas, sino que están dispersas en el citoplasma. Cada una de las estructuras ovaladas intensamente coloreadas es una cisterna individual, en la que el color se debe a la localización de moléculas de proteína con tinción fluorescente. Las cisternas de color verde contienen una proteína marcada con GFP (Vrg4) que interviene en las actividades iniciales del aparato de Golgi, mientras que las cisternas de color rojo contienen una proteína marcada con DsRed (Sec7) que participa en actividades tardías de dicho complejo. Esta serie de micrografías revela la composición proteínica de cisternas individuales durante un lapso aproximado de 13 min (el tiempo transcurrido se indica en el ángulo inferior izquierdo). La punta de flecha y la flecha señalan dos de estas cisternas todo el tiempo. Estas dos cisternas se automicrografiaron en las filas inferiores de micrografías. En esta serie se aprecia que la composición proteínica de una cisterna individual cambia con el tiempo de una con proteínas de Golgi "tempranas" (verde) a otra con proteínas de Golgi "tardías" (rojo). Estos descubrimientos dan apoyo visual directo al modelo de maduración de las cisternas que se analiza en la página 296. (REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE EUGENE LOSEV, ET AL., CORTESÍA DE BENJAMIN S. GLICK; NATURE 441:1004, 2006; © 2006, MACMILLAN MAGAZINES LTD.)

18.1 EL MICROSCOPIO ÓPTICO

Los microscopios son instrumentos que producen una imagen aumentada de un objeto. La figura 18-1 muestra los componentes principales de un microscopio óptico compuesto. Una fuente de luz, que puede ser externa al microscopio o estar incluida en su base, ilumina la muestra. La *lente condensadora* subyacente reúne los rayos difusos de la fuente de luz e ilumina el espécimen con un pequeño cono de luz brillante que permite ver las partes muy pequeñas del espécimen después de la magnificación. Los rayos de luz enfocados en la muestra por la lente condensadora se reciben en la **lente del objetivo** del microscopio.

A partir de este punto es necesario considerar dos conjuntos de rayos lumínicos que entran a la lente del objetivo: los que ya alteró el espécimen y los que no modificó (fig. 18-2). Este último grupo se refiere a la luz proveniente del condensador que pasa en forma directa a la lente del objetivo y constituye la luz de fondo del campo visual. El primer grupo de rayos lumínicos emana de las múltiples partes del espécimen. La lente del objetivo enfoca estos rayos de luz para formar una imagen real y magnificada del objeto dentro de la columna del microscopio (fig. 18-1). Un segundo sistema de lentes, la *lente ocular*, emplea la imagen formada por la lente del objetivo como objeto para formar una imagen virtual y aumentada. Un tercer sistema de lentes localizado en la parte frontal del ojo utiliza la imagen virtual producida por la lente ocular como objetivo para producir una imagen real en la retina. Cuando el tornillo de enfoque del microscopio de luz se gira, la distancia relativa entre la muestra y la lente del objetivo cambia, lo que permite que la imagen final se enfoque con exactitud en el plano de la retina. La magnificación total obtenida por el microscopio es el producto de las magnificaciones logradas por la lente del objetivo y la lente del ocular.

Resolución

Hasta este punto sólo se consideró la magnificación de un objeto sin prestar atención a la calidad de la imagen producida, o sea, a la extensión en la que los detalles del espécimen se conservan en la imagen. Supóngase que se mira una estructura en el microscopio con una lente de objetivo relativamente potente (p. ej., 63×) y una lente ocular que amplifica la imagen del objetivo cinco veces más (un ocular 5×). Asúmase que el campo está compuesto por cromosomas y es importante identificar el número que hay, pero algunos están muy cerca unos de los otros y no pueden distinguirse como estructuras separadas (fig. 18-3*a*). Una solución al problema podría ser cambiar los oculares para incrementar el tamaño de los objetos que se observan. Si se cambiara de un ocular 5× a uno 10×, lo más probable es que la capacidad para contar el número de cromosomas aumentara (fig. 18-3*b*) porque ahora la imagen de los cromosomas producida por la lente del objetivo se extiende sobre una parte más grande de la retina. Mientras más fotorreceptores proporcionen información respecto a la imagen, más detalles pueden verse (fig. 18-4). Sin embargo, si se cambia a un ocular 20×, no es probable que se perciban más detalles aunque la imagen sea más grande (fig. 18-3*c*), es decir, que ocupe más superficie retiniana. El cambio de ocular no brinda más información porque la imagen

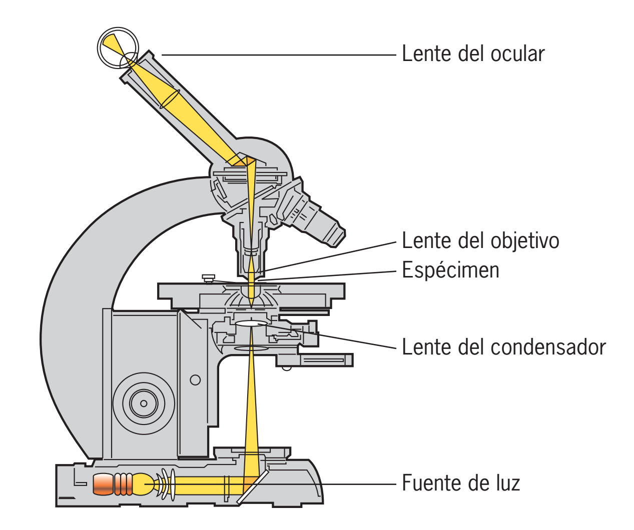


FIGURA 18-1 Diagrama de un corte a través de un microscopio óptico compuesto, es decir, un microscopio que tiene lentes tanto de objetivo como ocular.

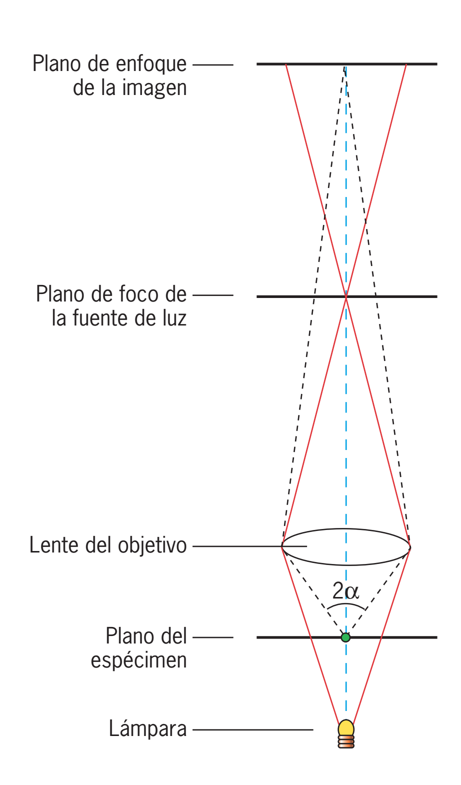


FIGURA 18-2 Trayectos que siguen los rayos de luz que forman la imagen del espécimen y los que forman la luz de fondo del campo. Los rayos de luz del espécimen se enfocan en la retina, mientras que los rayos del fondo están fuera de foco, con lo que se produce un campo brillante difuso. Como se explica más adelante en el texto, el poder de resolución de una lente de objetivo es proporcional al seno del ángulo alfa (α). Las lentes con mayor poder de resolución tienen longitudes focales más cortas, lo que significa que el espécimen se sitúa más cerca de la lente de objetivo cuando se enfoca.

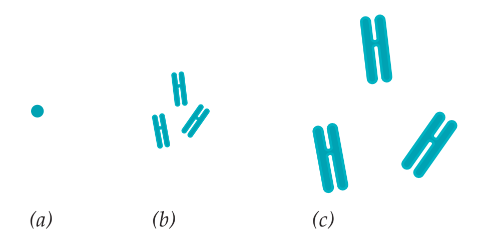


FIGURA 18-3 **Magnificación contra resolución.** La transición de *a* a *b* proporciona al observador una mayor magnificación y resolución, mientras que la transición de *b* a *c* sólo produce una mayor magnificación (magnificación vacía). De hecho la calidad de la imagen se deteriora conforme la magnificación vacía aumenta.

producida por el objetivo no tiene más detalles que aumentar con el mayor poder del ocular. El segundo cambio en el ocular sólo brinda *magnificación vacía* (como en la figura 18-3*c*).

La calidad óptica de una lente del objetivo se mide por la extensión en la que pueden discriminarse, o resolverse, los detalles finos de una muestra. La difracción limita la **resolución** que se obtiene con un microscopio. A causa de la difracción, la luz que emana de un punto del espécimen nunca puede verse como un punto en la imagen sino sólo como un pequeño disco. Si los discos producidos por dos puntos cercanos se superponen, los puntos no pueden distinguirse en la imagen (como en la figura 18-4). Por tanto, el poder de resolución de un microscopio puede definirse en términos de la capacidad para ver dos puntos vecinos en el campo visual como dos entidades distintas. El poder de resolución de un microscopio está limitado por la longitud de onda de la iluminación de acuerdo con la ecuación

$$d = \frac{0.61 \ \lambda}{n \text{ sen } \alpha}$$

donde d es la distancia mínima que debe separar dos puntos en el espécimen para resolverse, lambda (λ) es la longitud de onda de la luz (527 nm para la luz blanca) y n es el índice refractivo del medio presente entre el espécimen y la lente del objetivo. Alfa (α) es igual a la mitad del ángulo del cono de luz que entra a la lente del objetivo, como se muestra en la figura 18-2. Alfa es una medida de la capacidad de reunión de luz de la lente y mantiene una relación directa con su abertura.

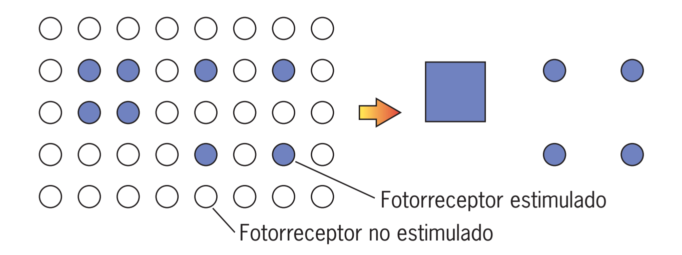


FIGURA 18-4 **El poder de resolución del ojo.** Ilustración de la relación entre la estimulación de los fotorreceptores individuales (izquierda) y la imagen que se percibiría (derecha). Este diagrama ilustra el valor de que la imagen caiga sobre una superficie lo bastante grande de la retina.

El denominador de la ecuación en la columna 1 se conoce como *abertura numérica* (*N.A.*). La abertura numérica es una constante para cada lente, una medida de sus calidades para reunir luz. La N.A. máxima posible para un objetivo que se diseña para usarlo en el aire es 1.0 porque el seno del máximo ángulo posible de alfa, 90°, es 1, y el índice refractivo del aire es 1.0. Para un objetivo diseñado para sumergirse en aceite, la N.A. máxima posible se acerca a 1.5. Como regla práctica general, la mayor magnificación útil de un microscopio fluctúa entre 500 y 1 000 veces la abertura numérica de la lente del objetivo que se utilice. Los intentos para aumentar la imagen después de este punto producen magnificación vacía y la calidad de la imagen se deteriora. Una abertura numérica alta se logra con lentes que tienen una distancia focal corta, lo que permite colocar la lente muy cerca del espécimen.

El **límite de resolución** del microscopio óptico puede establecerse si se sustituye la longitud de onda mínima posible de iluminación y la mayor abertura numérica posible en la ecuación previa. Cuando estas sustituciones se hacen, se obtiene un valor un poco menor de 0.2 μm (o 200 nm), que es suficiente para observar organelos celulares grandes, como los núcleos y las mitocondrias. En cambio, el límite de resolución del ojo desnudo, que tiene una abertura numérica cercana a 0.004, se aproxima a 0.1 mm (0.0036 pulg).

Además de estos factores teóricos, el poder de resolución también depende de los defectos ópticos, o *aberraciones.* Existen siete aberraciones ópticas importantes y constituyen las limitaciones que los fabricantes de lentes deben vencer para producir lentes de objetivo cuyo poder de resolución real se aproxime a los límites teóricos. El objetivo está hecho con una serie compleja de lentes, en lugar de una sola lente convergente, a fin de eliminar estas aberraciones. Por lo general una unidad de lente proporciona la magnificación requerida, en tanto que las demás compensan los errores de la primera para brindar una imagen general corregida.

Visibilidad

En el lado más práctico de la microscopia de los límites de la resolución se encuentra el tema de la *visibilidad*, que se refiere a los factores que en realidad permiten observar un objeto. Esto podría parecer un asunto trivial; si el objeto está ahí, puede verse. Considérese el caso de una cuenta de vidrio transparente. Bajo la mayoría de las condiciones, contra casi todos los fondos, la cuenta se ve con claridad. Sin embargo, si una cuenta de vidrio se deja caer en un recipiente con aceite de inmersión con el mismo índice refractivo que el vidrio, la cuenta desaparece de la vista porque ya no afecta la luz de ninguna manera obvia que sea distinta al líquido de fondo. Cualquiera que haya pasado tiempo buscando una ameba puede apreciar el problema de la visibilidad con el microscopio óptico.

Lo que se ve a través de una ventana o por un microscopio son los objetos que afectan la luz de manera distinta al fondo. Otro término para la visibilidad en este sentido de la palabra es el **contraste**, o la diferencia en la apariencia entre las partes adyacentes de un objeto o entre un objeto y su fondo. La necesi-

dad del contraste puede apreciarse si se consideran las estrellas. En tanto que el cielo claro de la noche puede estar lleno de estrellas, el mismo cielo durante el día parece carente de cuerpos celestes. Las estrellas desaparecieron de la vista, pero no del cielo. Ya no son visibles contra el fondo mucho más brillante.

En el mundo macroscópico, para examinar objetos se hace caer la luz sobre ellos y luego se observa la luz que se refleja a los ojos del observador. En cambio, cuando se utiliza un microscopio el espécimen se coloca entre la fuente de luz y los ojos, y se ve la luz que se transmite a través del objeto (o en términos más apropiados, la que difracta el objeto). Si una persona toma un objeto, entra a una habitación con una fuente de luz y lo sujeta entre la fuente de luz y sus ojos, puede apreciarse parte de la dificultad con tal iluminación; es necesario que el objeto que se examina sea casi transparente, o bien, translúcido. Aquí radica otro aspecto del problema: los objetos que son "casi transparentes" pueden ser difíciles de ver.

Una de las mejores formas para hacer que un espécimen delgado y translúcido sea visible al microscopio es teñirlo con algún pigmento, que absorba sólo ciertas longitudes de onda del espectro visible. Las longitudes de onda que no se absorben se transmiten al ojo, lo que hace que el objeto teñido parezca coloreado. Los distintos tintes se unen con diferentes tipos de moléculas biológicas, por lo que estos procedimientos no sólo incrementan la visibilidad del espécimen, también indican en qué puntos de la célula o tejido se encuentran los distintos tipos de sustancias. Un buen ejemplo es la tinción de Feulgen, que es específica para el DNA (ácido desoxirribonucleico); hace que los cromosomas se vean coloreados al microscopio (fig. 18-5).

FIGURA 18-5 La tinción de Feulgen. Este procedimiento de tinción es específico para el DNA, como lo indica la localización del pigmento en los cromosomas en esta célula de la punta de la raíz de cebolla que estaba en la metafase de la mitosis al momento que se fijó. (Por Ed Reschke/Peter Arnold, Inc.)

Un problema con las tinciones es que casi nunca pueden usarse con células vivas; por lo general son tóxicas o las condiciones de tinción son tóxicas, o los tintes no penetran la membrana plasmática. Por ejemplo, la tinción de Feulgen requiere la hidrólisis del tejido en ácido antes de aplicar el pigmento.

Los diferentes tipos de microscopios ópticos usan distintos tipos de iluminación. En un **microscopio de campo brillante**, el cono de luz que ilumina la muestra se ve como fondo brillante contra el que la imagen del espécimen debe contrastarse. La microscopia de campo brillante es ideal para las muestras de alto contraste, como los cortes teñidos de tejidos, pero es probable que no se obtenga la visibilidad óptima para otros especímenes. En las secciones siguientes se consideran varios medios alternativos para hacer que las muestras sean más visibles en un microscopio óptico.

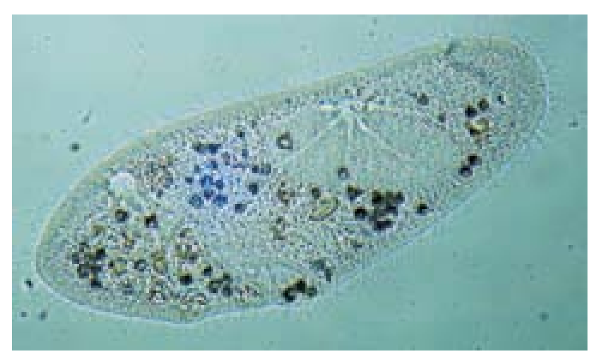
Preparación de especímenes para microscopia óptica

Los especímenes a observar en el microscopio óptico se dividen en dos categorías amplias: monturas completas y cortes. Una **montura completa** es un objeto intacto, ya sea vivo o muerto, y puede consistir en un microorganismo entero como un protozoario o en una pequeña parte de un organismo más grande. La mayoría de los tejidos de plantas y animales son demasiado opacos para su análisis microscópico, a menos que éstos se examinen como una rebanada muy delgada, o **corte**. Para preparar un corte, primero se matan las células mediante inmersión del tejido en alguna solución química llamada **fijador**. Un buen fijador penetra pronto en la membrana celular e inmoviliza todo su material macromolecular, de modo que la estructura de la célula se mantiene lo más similar posible a la de la célula viva. Los fijadores más usuales para la microscopia óptica son soluciones de formaldehído, alcohol o ácido acético.

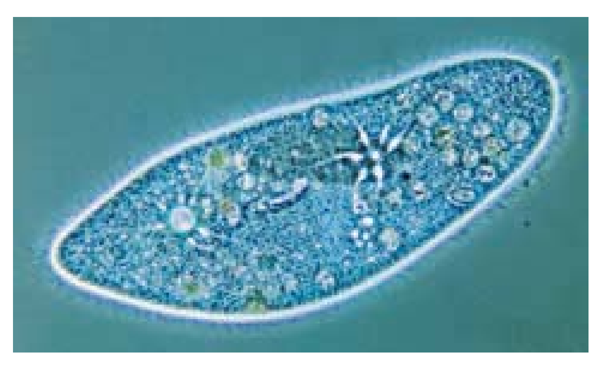
Tras la fijación, el tejido se deshidrata por transferencia a través de una serie de alcoholes y luego se impregna con parafina (cera), lo que brinda soporte mecánico durante el proceso de corte. La parafina se utiliza como un medio de impregnación porque rara vez se disuelve con solventes orgánicos. Las laminillas que contienen cortes adherentes de parafina se sumergen en tolueno, que disuelve la cera y deja una rebanada delgada de tejido unido a la laminilla, donde puede teñirse o tratarse con enzimas, anticuerpos u otros agentes. Después de la tinción se coloca un cubreobjetos sobre el tejido con un medio de montaje que tenga el mismo índice refractivo que el portaobjetos y el cubreobjetos.

Microscopia con contraste de fase

Los especímenes pequeños y no teñidos, como una célula viva, pueden ser muy difíciles de ver con un microscopio de campo brillante (fig. 18-6*a*). El **microscopio con contraste de fase** torna más visibles los objetos muy transparentes (fig. 18-6*b*). Pueden distinguirse diferentes partes de un objeto porque afectan la luz de manera distinta cada uno de ellos. Una base de estas diferencias es el índice refractivo. Los organelos celulares están constituidos por distintas proporciones de varias moléculas:



(a)



(b)

(c)

FIGURA 18-6 Comparación de células vistas con diferentes tipos de microscopios ópticos. Micrografías ópticas de un protista ciliado tal como se observa en un campo brillante (*a*) con contraste de fase (*b*) y con óptica de contraste por interferencia diferencial (DIC) [o de Nomarski (*c*)]. El organismo apenas es visible con la iluminación de campo brillante, pero se ve con claridad en la microscopia con contraste de fase y con DIC. (MICROGRAFÍAS POR M. I. WALKER/PHOTO RESEARCHERS, INC.)

DNA, RNA (ácido ribonucleico), proteína, lípido, carbohidrato, sales y agua. Es probable que las regiones con composición diferente tengan índices de refracción distintos. En condiciones normales el ojo humano no puede detectar tales diferencias. Sin embargo, el microscopio con contraste de fase convierte las diferencias del índice de refracción en diferencias de intensidad (brillantez y oscuridad relativas) que son visibles para el ojo humano. Los microscopios con contraste de fase logran esto: 1) mediante la separación de la luz directa que entra a la lente del objetivo desde la luz difractada que proviene del espécimen y 2) al hacer que los rayos de luz de estas dos fuentes *interfieran* unos con los otros. La brillantez u oscuridad relativa de cada parte de la imagen refleja la forma en que la luz de esa parte del espécimen interfiere con la luz directa.

Los microscopios con contraste de fase son más útiles para examinar componentes intracelulares de células vivas con una resolución hasta cierto punto alta. Por ejemplo, la movilidad dinámica de las mitocondrias, los cromosomas mitóticos y las vacuolas puede seguirse y filmarse con este sistema óptico. La mera observación del modo en que las diminutas partículas y vacuolas de las células se mueven de un lado a otro al azar dentro de una célula viva causa una emoción respecto a la vida que no puede obtenerse si se observan células muertas y teñidas. El mayor beneficio aportado por la invención del microscopio de contraste de fase no fue el descubrimiento de nuevas estructuras, sino su empleo diario en laboratorios de investigación y enseñanza para observar células de manera más reveladora.

El microscopio de contraste de fase tiene limitaciones ópticas que producen pérdida de resolución y la imagen se afecta por halos que interfieren y sombras producidas en sitios donde el índice refractivo experimenta cambios súbitos. El microscopio de contraste de fase es un tipo de *microscopio de interferencia*. Otros tipos de microscopios de interferencia minimizan estos artefactos ópticos al lograr una separación completa de los rayos directos y difractados con trayectos complejos de luz y prismas. Otro tipo de sistema de interferencia, llamado *contraste de interferencia diferencial* (*DIC*), o a veces interferencia de Nomarski en honor de su diseñador, presenta una imagen que tiene una calidad tridimensional aparente (fig. 18-6*c*). El contraste en la microscopia DIC depende de la velocidad de cambio del índice refractivo en la muestra. En consecuencia, los bordes de las estructuras, donde el índice refractivo varía mucho en una distancia más o menos corta, se ven con muy buen cambio.

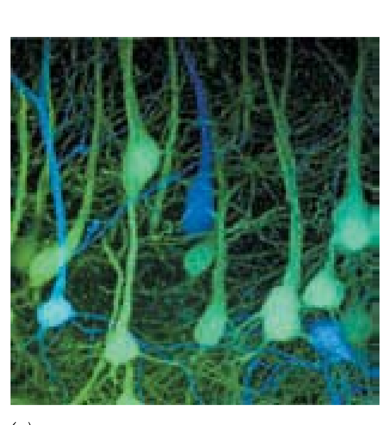
Microscopia de fluorescencia (y técnicas relacionadas basadas en la fluorescencia)

En los dos últimos decenios, el microscopio óptico se ha transformado de un instrumento diseñado principalmente para examinar cortes de tejidos fijos, a un instrumento capaz de mostrar los sucesos dinámicos que ocurren a nivel molecular en las células vivas. En gran medida, estos avances en la visualización de células vivas han sido posibles gracias a innovaciones en la *microscopia de fluorescencia*. Esta última permite observar la localización de determinados compuestos (llamados *fluorocromos* o *fluoróforos*) que absorben radiación ultravioleta invisible y emiten porciones de la energía en las longitudes de onda visibles, más largas, un fenómeno que se conoce como *fluorescencia*. La fuente de luz en un microscopio de este tipo produce un rayo de luz ultravioleta que viaja por un filtro, el cual bloquea todas las longitudes de onda excepto la capaz de excitar el fluorocromo. El rayo de luz monocromática se enfoca en el espécimen que contiene el fluorocromo, que se excita y emite luz de longitud de onda visible para el observador. Como la fuente de luz produce sólo luz ultravioleta (negra), los objetos teñidos con un fluorocromo parecen tener un color brillante contra un fondo negro, lo que brinda un gran contraste.

Existen muchas maneras distintas en que los compuestos fluorescentes pueden usarse en biología celular y molecular. En una de sus aplicaciones más usuales, un fluorocromo (como la rodamina o la fluoresceína) se une en forma covalente (*conjugada*) con un anticuerpo para producir un anticuerpo fluorescente que puede emplearse a fin de establecer la localización de una proteína específica dentro de la célula. Esta técnica se denomina *inmunofluorescencia* y se ilustra en la micrografía de la figura 9-29*a*. La inmunofluorescencia se describe mejor en la página 776. Los fluorocromos también pueden usarse para localizar las moléculas de DNA o RNA que contienen secuencias de nucleótidos específicas, como se describe en la página 407 y se ilustra en la figura 10-19. En otros ejemplos los fluorocromos se emplean para estudiar el tamaño de las moléculas que pueden pasar entre las células (véase fig. 7-33), como indicadores de potenciales transmembrana (véase fig. 5-20) o como sondas para determinar la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol (véase fig. 15-27). El uso de fluorocromos sensibles al calcio se explica en la página 646.

Las proteínas con marca fluorescente también pueden utilizarse para estudiar procesos dinámicos mientras ocurren en células vivas. Por ejemplo, un fluorocromo específico puede unirse con una proteína celular, como la actina o la tubulina, y la proteína con marca fluorescente puede inyectarse en una célula viva (como en la figura 9-4). En fechas recientes se emplea mucho una técnica no invasiva que recurre a una proteína fluorescente (proteína verde fluorescente o GFP) de la medusa *Aequorea victoria* como se ilustra en las micrografías iniciales de este capítulo en la página 727. En la mayoría de estos estudios se construye un DNA recombinante en el que la región codificadora de la GFP se une con la región codificadora de la proteína en estudio. El DNA recombinante se usa para transfectar células, las cuales sintetizan luego una proteína quimérica que contiene GFP fusionada con la proteína en cuestión. El uso de la GFP para estudiar la dinámica de la membrana se explica en la página 278. En todas estas estrategias las proteínas marcadas participan en las funciones celulares normales y su localización puede seguirse con el microscopio para revelar las actividades dinámicas en las que la proteína participa (véanse figs. 8-4 y 9-2).

A menudo los estudios pueden aportar más información con el uso simultáneo de variantes de GFP que tienen propiedades espectrales distintas. Se produjeron las variantes de GFP con fluorescencia en tonos azules (BFP), amarillo (YFP) y azul claro (cian, *CFP*) mediante mutagénesis directa del gen *GFP*. Además se aisló una proteína fluorescente roja con una relación distante (DsRed) de una anémona marina. En experimentos de mutagénesis también se han generado variantes monoméricas de DsRed (p. ej., mBanana, mTangerine y mOrange), que emiten fluorescencia en distintos colores reconocibles. El tipo de información que puede obtenerse con las variantes de GFP, se ilustra con el estudio de la figura 18-7, en el que los investigadores generaron cepas de ratones cuyas neuronas contenían proteínas fluorescentes de diferentes colores. Cuando un músculo de uno de estos ratones se exponía por medios quirúrgicos, los investigadores podían observar las interacciones dinámicas entre las neuronas de diversos colores y las uniones neuromusculares inervadas (véase la figura 4-54, que presenta un dibujo de este tipo de unión). Por ejemplo, observaron cómo las ramas de una neurona coloreada con CFP competían con las de una neurona coloreada con YFP por establecer contacto sináptico con el tejido muscular. En cada caso encontraron que cuando dos neuronas compiten por la inervación de diferentes fibras musculares, todas las ramas "ganadoras" pertenecen a una de las neuronas, en tanto que todas las ramas "perdedoras" pertenecen a la otra neurona (fig. 18-7*b*). Las micrografías del inicio de este capítulo constituyen otro ejemplo de todo lo que puede aprenderse mediante el marcado de proteínas con dos fluorocromos distintos. En este caso, la estrategia de etiqueta doble ha permitido a los investigadores seguir los movimientos simultáneos de dos proteínas distintas en tiempo real dentro de las fronteras de un organelo celular individual.


(*a*)

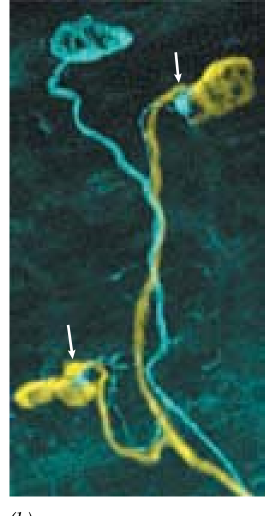

(*b*)

FIGURA 18-7 Uso de variantes de GFP para seguir las interacciones dinámicas entre neuronas y sus células blanco in vivo. *a*) Una porción de cerebro de un ratón con dos neuronas fluorescentes de colores diferentes. Estos ratones se obtienen mediante el apareamiento de animales transgénicos cuyas neuronas se marcan con una u otra proteína fluorescente. *b*) Micrografía con fluorescencia de porciones de dos neuronas, una marcada con YFP y otra marcada con CFP. Las flechas indican dos uniones neuromusculares distintas en dos fibras musculares diferentes en las que la rama axonal marcada con YFP venció a la rama marcada con CFP. La tercera unión está inervada con el axón marcado con CFP en ausencia de competencia. (*A*, CORTESÍA DE N. KASTHURI Y J. W. LICHTMAN, WASHINGTON UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE; *B*, REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE NARAYANAN KASTHURI Y JEFF W. LICHTMAN, NATURE 424:429, 2003; © 2003, MACMILLAN MAGAZINES LTD.)

Las variantes de GFP también son útiles en una técnica llamada *transferencia de energía por resonancia de fluorescencia* (*FRET*), que se emplea para medir cambios en la distancia entre dos partes de una proteína (o entre dos proteínas separadas dentro de una estructura más grande). La FRET puede usarse para estudiar estos cambios mientras ocurren in vitro o dentro de una célula viva. La técnica FRET se basa en el hecho de que la energía de excitación puede transferirse de un grupo fluorescente (un donante) a otro grupo fluorescente (un receptor), siempre y cuando ambos grupos estén muy próximos (1 a 10 nm). Esta transferencia de energía reduce la intensidad de la fluorescencia del donante e incrementa la intensidad de fluorescencia del

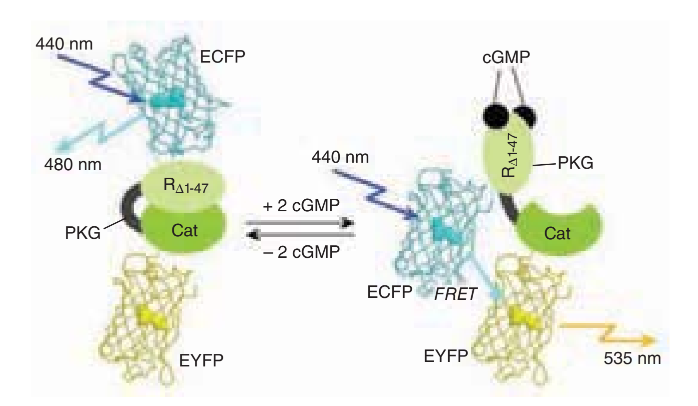


FIGURA 18-8 Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). Este esquema muestra un ejemplo del uso de la tecnología FRET para seguir el cambio en la conformación de una proteína (PKG) después de la unión con cGMP. Las dos proteínas pequeñas fluorescentes con forma de barril (CFP intensificada [ECFP] y YFP intensificada [EYFP]) se muestran en su color fluorescente. En ausencia de cGMP, la excitación de ECFP con luz de 440 nm produjo la emisión de luz de 480 nm de la proteína fluorescente. Después de la unión con cGMP, un cambio en la conformación en PKG aproxima lo suficiente las dos proteínas fluorescentes para que la FRET ocurra. Como resultado la excitación del donante de ECFP con luz de 440 nm produce la transferencia de energía al receptor de EYFP y la emisión de luz de 535 nm del receptor. Las versiones intensificadas de estas proteínas tienen mayor intensidad de fluorescencia y tienden a ser más estables que la molécula proteínica original. (Tomada de Moritoshi Sato, et al., por cortesía de Yoshio Umezawa, Anal. Chem. 72:5924, 2000.)

receptor. La eficiencia de la transferencia entre dos grupos fluorescentes unidos con sitios de una proteína disminuye mucho cuando la distancia entre los dos grupos aumenta. Como resultado la determinación de los cambios en la fluorescencia de los grupos donante y receptor que se producen durante algún proceso brinda una medida de los cambios en la distancia entre ellos en las distintas etapas del proceso. Esta técnica se ilustra en la figura 18-8, en la que dos variantes de GFP (marcadas ECFP y EYFP) se unieron en forma covalente con dos partes distintas de una cinasa de proteína para unión con cGMP (PKG). En ausencia de un cGMP unido, los dos fluorocromos están demasiado separados para que haya transferencia de energía. La unión de cGMP induce un cambio en la conformación de la proteína que aproxima los dos fluorocromos lo suficiente para que la FRET ocurra. La FRET también puede emplearse para seguir procesos como el plegamiento de una proteína o la asociación y disociación de los componentes dentro de una membrana. La separación de las colas citoplásmicas de subunidades de integrina después de la activación por talina (fig. 7-14) es un ejemplo de suceso que se ha estudiado por FRET.

Microscopia con video y procesamiento de imágenes

Así como el campo microscópico puede verse con los ojos o filmarse con una cámara, también puede verse por medios electrónicos y grabarse con una videocámara. Las videocámaras ofrecen varias ventajas para visualizar especímenes. Se construyen tipos especiales de videocámaras (llamadas dispositivo acoplado a la carga [CCD, del inglés *charge coupled device*], o cámaras CCD) que son muy sensibles a la luz, lo que les permite obtener imágenes con iluminación escasa. Esto es muy útil cuando se observan especímenes vivos, a los que el calor de una fuente luminosa daña con facilidad y especímenes con tinción fluorescente, que se desvanece en poco tiempo con la exposición a la luz. Además las videocámaras pueden detectar y amplificar diferencias muy pequeñas en el contraste dentro de un espécimen, de manera que los objetos muy pequeños se tornan visibles. Por ejemplo, las fotografías de la figura 9-6 muestran una imagen de un microtúbulo individual (0.025 μm de diámetro) que está por debajo del límite de resolución de un microscopio óptico estándar (0.2 μm). Como una ventaja adicional las imágenes obtenidas con videocámaras pueden convertirse en imágenes digitales electrónicas y someterse a procesamiento por computadora para aumentar mucho su contenido de información.[1] En una técnica, el fondo desenfocado distractor de un campo visual se almacena en la computadora y luego se sustrae de la imagen que contiene el espécimen. Esto incrementa mucho la claridad de la imagen. De igual manera, las diferencias de brillantez en la imagen pueden convertirse en diferencias de color, lo que las vuelve mucho más evidentes al ojo humano.

Microscopia confocal de barrido láser

El uso de videocámaras, imágenes electrónicas y procesamiento por computadora condujo al renacimiento de la microscopia óptica en los últimos 20 años. También contribuyó el desarrollo de un nuevo microscopio óptico. Cuando se examina una célula completa o un corte de algún órgano con un microscopio óptico estándar, el observador ve el espécimen a distintas profundidades si cambia la posición del objetivo mediante la rotación del tornillo de enfoque. Mientras lo hace, distintas partes del espécimen entran y salen de foco. Sin embargo, el hecho de que el espécimen contenga diferentes enfoques disminuye la capacidad para formar una imagen flamante porque las partes del espécimen por arriba y por abajo del plano de foco interfieren con los rayos de luz de la parte que está en el plano del foco. A finales del decenio de 1950, Marvin Minsky del *Massachusetts Institute of Technology* inventó un instrumento revolucionario llamado **microscopio confocal de barrido láser** que produce una imagen de un plano delgado situado dentro de un espécimen mucho más grueso. La figura 18-9 muestra un diagrama de los componentes ópticos y los trayectos de luz en una versión moderna de un microscopio óptico de barrido confocal de fluorescencia. En este tipo de microscopio la muestra se ilumina con un rayo láser con un enfoque fino que barre rápidamente el espécimen a una sola profundidad, con lo que sólo ilumina un plano delgado (o "corte *óptico*") dentro de la muestra. Como se describió antes, los

[1] La conversión de una imagen electrónica análoga, como la que se obtiene con una videocámara, en una imagen electrónica digital, como la obtenida con una cámara digital y almacenada en un disco, se denomina digitalización. Las imágenes digitales consisten en una cantidad discreta de elementos pictográficos (pixeles), cada uno de los cuales tiene un color y un valor de brillantez asignados correspondientes a ese sitio en la imagen original.

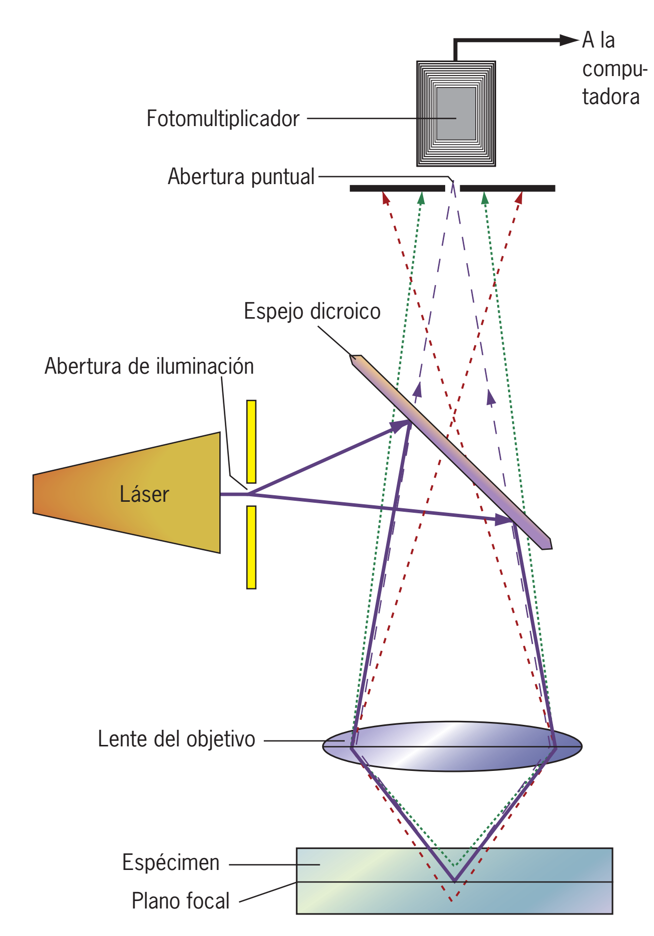


FIGURA 18-9 **Trayectos de la luz en un microscopio confocal de fluorescencia.** Una fuente de luz láser emite luz de longitud de onda corta (azul), pasa por una abertura diminuta y se refleja en un espejo dicroico (un tipo de espejo que refleja ciertas longitudes de onda y transmite otras) hasta una lente del objetivo para enfocarse en un punto en el plano del espécimen. Los fluorocromos de la muestra absorben la luz incidente y emiten luz con mayor longitud de onda, que puede pasar por el espejo dicroico y enfocarse en un plano que contiene una abertura diminuta. La luz pasa luego a un tubo fotomultiplicador que amplifica la señal, la cual se transmite a una computadora que forma una imagen digital procesada. Se impide el paso de cualquier rayo de luz que se emita desde arriba o abajo del plano óptico en el espécimen por la abertura diminuta, por lo que no contribuye a la formación de la imagen. Este diagrama muestra la iluminación de un solo punto en la muestra. Diferentes sitios dentro de este plano del espécimen se iluminan mediante un proceso de exploración láser. El diámetro del orificio de alfiler es ajustable. A menor abertura, más delgada la sección óptica y mayor la resolución, pero menos intensa la señal.

fluorocromos absorben la luz incidente de longitud de onda corta y la emiten de nuevo en una longitud de onda mayor. La luz que el espécimen emite se enfoca en un sitio al interior del microscopio que contiene una abertura puntual. Por tanto, la abertura y el plano iluminado son confocales. Los rayos de luz emitidos por el plano iluminado de la muestra pueden pasar por la abertura, mientras que el paso de cualquier otro rayo de luz que pudiera emanar de un plano superior o inferior al plano determinado se impide para que no participe en la formación de la imagen. En consecuencia, los puntos fuera de foco del espécimen se tornan invisibles.

La figura 18-10 presenta micrografías de un solo núcleo celular que se tomaron en tres planos distintos del espécimen. Es evidente que los objetos fuera del plano de enfoque tienen poco efecto en la calidad de la imagen de cada corte. Si se desea, las imágenes de cortes ópticos separados pueden almacenarse en una computadora y fusionarse para reconstruir un modelo tridimensional de todo el objeto.

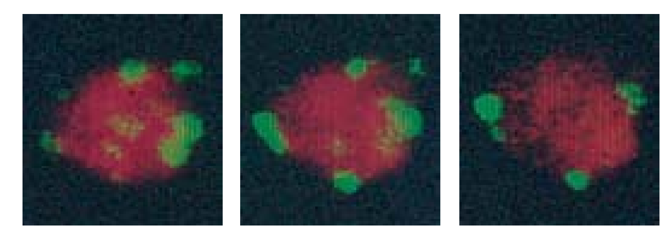
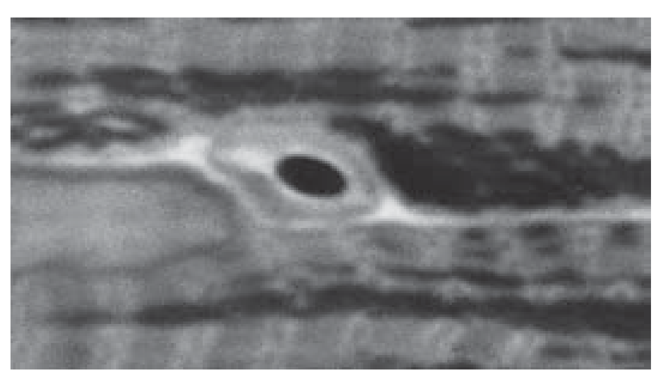


FIGURA 18-10 **Micrografías de fluorescencia confocal de tres cortes ópticos** de 0.3 μm de grueso de un núcleo de levadura teñido con dos anticuerpos distintos con marcas fluorescentes. El anticuerpo fluorescente rojo tiñó el DNA dentro del núcleo y el anticuerpo fluorescente verde tiñó una proteína de unión telomérica que se localiza en la periferia del núcleo. (Tomada de Thierry Laroche y Susan M. Gasser, Cell 75:543, 1993. Con autorización de Cell Press.)

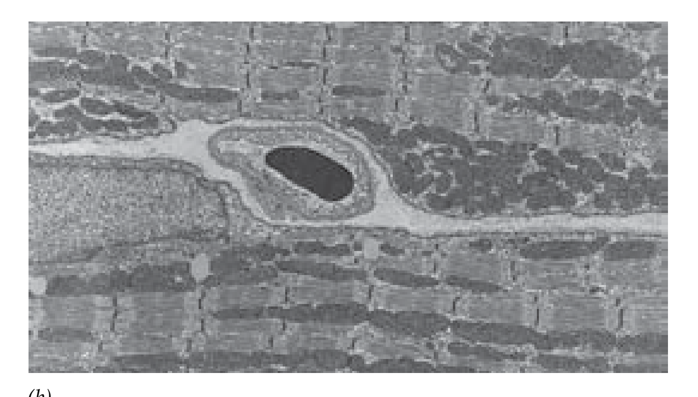
18.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Las micrografías electrónicas que se muestran en este texto fueron tomadas con dos tipos distintos de microscopios electrónicos. Los *microscopios electrónicos de transmisión* (*TEM*) forman imágenes con los electrones que se transmiten a través de un espécimen, mientras que los *microscopios electrónicos de barrido* (*SEM*) utilizan electrones que rebotan en la superficie del espécimen. Todos los comentarios de esta sección del capítulo se refieren al uso del TEM; el de barrido se describe por separado en la página 740.

El microscopio electrónico de transmisión puede proporcionar mucha mayor resolución que el microscopio óptico. Esto se ilustra con la comparación de las dos fotografías de la figura 18-11, que muestran imágenes de cortes adyacentes del mismo tejido con la misma magnificación, con un microscopio óptico y con uno electrónico. Aunque la fotografía de la figura 18-11*a* está casi al límite de la resolución del microscopio óptico, la de la figura 18-11*b* es una micrografía electrónica de muy baja potencia. El gran poder de resolución del microscopio electrónico se deriva de las propiedades de ondas de los electrones. Como se indica en la ecuación de la página 729, el límite de resolución de un microscopio está en proporción directa con la longitud de onda de la luz: mientras mayor sea la longitud de onda, es menor la resolución. A diferencia de un fotón de luz que tiene una longitud de onda constante, la longitud de onda de un electrón varía con la velocidad a la que la partícula viaja, que a su vez



(a)



(b)

FIGURA 18-11 Comparación entre la información obtenida en las imágenes tomadas con un microscopio óptico y uno electrónico con una magnificación comparable de 4 500 veces el tamaño real. *a*) Fotografía del tejido muscular esquelético que se impregnó en plástico, se cortó a 1 μm y se fotografió con un microscopio óptico con una lente de objetivo para aceite de inmersión. *b*) Un corte adyacente al empleado para la parte *a* que se cortó a 0.025 μm y se examinó al microscopio electrónico con una magnificación comparable a la imagen en *a*. La imagen resultante presenta un aumento de dos a uno en la resolución. Nótese la diferencia en los detalles de las miofibrillas musculares, las mitocondrias y el eritrocito contenido en el capilar. Mientras que el microscopio óptico no puede proporcionar ninguna información adicional a la de *a*, es posible que el microscopio electrónico brinde mucha más información; por ejemplo, puede producir imágenes de la estructura de membranas individuales dentro de una pequeña porción de una de las mitocondrias (como en la figura 5-21). (Cortesía de Douglas E. Kelly y M. A. Cahill.)

depende del voltaje de aceleración aplicado en el microscopio. Esta relación se define mediante la ecuación

$$\lambda = \sqrt{150/V}$$

donde, lambda (λ) es la longitud de onda en angstroms (Å) y *V* es el voltaje de aceleración en voltios. Los microscopios electrónicos de transmisión estándar operan con un espectro de voltaje de 10 000 a 100 000 V. A 60 000 V, la longitud de onda de un electrón se aproxima a 0.05 Å. Si esta longitud y la abertura numérica alcanzable con el microscopio óptico se sustituyeran en la ecuación de la página 729, el límite de resolución sería de unos 0.03 Å. En realidad la resolución alcanzable con un microscopio electrónico de transmisión estándar es de unos dos órdenes de magnitud menor que su límite teórico. Esto se debe a la aberración esférica grave de las lentes que enfocan los electrones, lo cual requiere que la abertura numérica de la lente sea muy pequeña (casi siempre entre 0.01 y 0.001). El límite práctico de resolución de los TEM estándar se halla entre 3 y 5 Å. Por lo general el límite real cuando se observa una estructura celular está entre 10 y 15 Å.

Los microscopios electrónicos consisten sobre todo en una columna alta, cilíndrica y hueca por la que pasa el rayo de electrones, y una consola que contiene un panel con discos que controlan la operación de la columna por medios electrónicos. En la parte superior de la columna se encuentra el cátodo, un filamento de alambre de tungsteno que se calienta para proveer una fuente de electrones. Los electrones se extraen del filamento caliente y se aceleran como un rayo fino mediante el voltaje aplicado entre el cátodo y el ánodo. El aire se bombea para sacarlo de la columna antes de la operación, lo que produce un vacío por el que los electrones viajan. Si no se extrajera el aire, los electrones se dispersarían antes de tiempo por colisión con las moléculas de gas.

Tal como un rayo de luz puede enfocarse con una lente de vidrio pulido, un rayo de electrones con carga negativa puede enfocarse con lentes electromagnéticas, las cuales se localizan en la pared de la columna. La fuerza de los magnetos se controla mediante la corriente que se les suministra, que está determinada por las posiciones de varios discos de la consola. La figura 18-12 muestra una comparación de los sistemas de lentes de un microscopio óptico y uno electrónico. Las lentes del condensa-

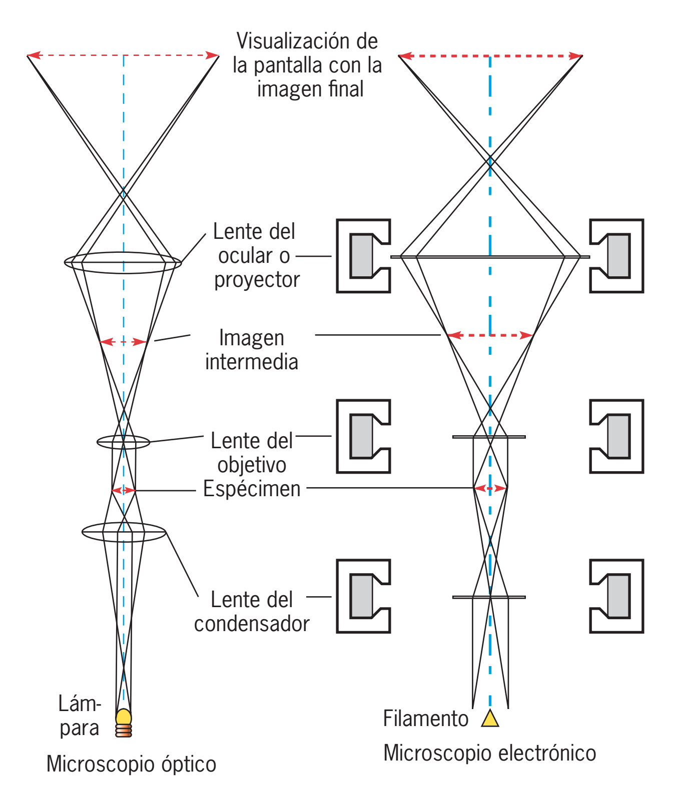


FIGURA 18-12 Comparación del sistema de lentes de un microscopio óptico y uno electrónico. (Tomada de W. Agar, Principles and Practice of Electron Microscope Operation, Elsevier/North-Holland, 1974.)

dor de un microscopio óptico se colocan entre la fuente de electrones y el espécimen, y enfocan el rayo de electrones sobre la muestra. Ésta se sostiene en una pequeña rejilla de metal (3 mm de diámetro) que se inserta con pinzas en el sujetador de la misma, que a su vez se inserta en la columna del microscopio.

Como las longitudes focales de las lentes de un microscopio electrónico varían según la corriente que se les aplique, una lente del objetivo proporciona todo el espectro de magnificación que el instrumento alcanza. Como en el microscopio óptico, la imagen del objetivo sirve como el objeto para un sistema de lentes adicional. La imagen que se obtiene del objetivo de un microscopio electrónico sólo tiene una magnificación de unas 100 veces pero, a diferencia del microscopio óptico, esta imagen posee los detalles suficientes para incrementarla 10 000 veces más. Al modificar la corriente que se aplica a las diversas lentes del microscopio, las magnificaciones varían desde 1 000 hasta 250 000 veces. Los electrones que pasaron por el espécimen se enfocan en una pantalla fosforescente situada en la base de la columna. Los electrones que golpean la pantalla excitan una cubierta de cristales fluorescentes que emiten su propia luz visible que el ojo percibe como una imagen del espécimen.

La formación de una imagen en el microscopio electrónico depende de la dispersión diferencial de los electrones por las distintas partes del espécimen. Considérese un rayo de electrones emitido por el filamento y enfocado en la pantalla. Si no hubiera un espécimen en la columna, el rayo de electrones iluminaría de manera uniforme la pantalla y se produciría una imagen brillante uniforme. Por el contrario, si se coloca un espécimen en el trayecto del rayo, algunos de los electrones golpean átomos de la muestra y se dispersan. Los electrones que rebotan de la muestra no pueden pasar por la abertura tan pequeña en el plano focal posterior de la lente del objetivo y por tanto no participan en la formación de la imagen.

La dispersión de los electrones por una parte del espécimen es proporcional al tamaño de los núcleos de los átomos que componen la muestra. Debido a que el material insoluble de las células está compuesto por átomos que tienen un número atómico hasta cierto punto bajo (carbono, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno), el material biológico tiene muy poca capacidad intrínseca para dispersar los electrones. Los tejidos se fijan y tiñen con soluciones de metales pesados (descritos más adelante) para aumentar la dispersión electrónica y obtener el contraste necesario. Estos metales penetran en la estructura de las células y forman complejos selectivos con diferentes partes de los organelos. Las partes de una célula que se unen con la mayor cantidad de átomos metálicos permiten el paso de menor cantidad de electrones. Entre menos electrones se enfoquen en la pantalla en un punto determinado, ese punto es más oscuro. Las fotografías de la imagen se hacen al quitar la pantalla del camino y permitir que los electrones golpeen una placa fotográfica en posición por debajo de la pantalla. Como las emulsiones fotográficas tienen una sensibilidad directa a los electrones, tanto como a la luz, una imagen del espécimen se registra directamente en la película.

Preparación del espécimen para la microscopia electrónica

Como sucede con el microscopio óptico, los tejidos a examinar con el microscopio electrónico deben fijarse, impregnarse y cortarse. La fijación del tejido para la microscopia electrónica (fig. 18-13) es mucho más crítica que para la microscopia óptica porque los cortes se someten a un escrutinio más intenso. Un fijador debe suspender la vida de la célula sin alterar mucho su estructura. Con el nivel de resolución del microscopio electrónico, los daños relativamente menores, como las mitocondrias hinchadas o el retículo endoplásmico roto, se vuelven muy evidentes. Para obtener la fijación más rápida y el menor daño celular, se fijan e impregnan fragmentos muy pequeños de tejido (menores de 1.0 mm^3). Los fijadores son sustancias que desnaturalizan y precipitan las macromoléculas celulares. Las sustancias con este efecto pueden ocasionar coagulación o precipitación de materiales que no tenían una estructura en la célula viva, lo que conduce a la formación de un **artefacto**. El mejor argumento de que una estructura particular no es un artefacto es la demostración de su existencia en células fijadas de diversos modos o, aún mejor, sin fijación alguna. Para visualizar células que no se fijaron, el tejido se congela con rapidez y se emplean técnicas especiales para revelar su estructura (véase criofijación y replicación por congelamiento y fractura más adelante). Los fijadores más usuales para la microscopia electrónica son el glutaraldehído y el tetróxido de osmio. El glutaraldehído es un compuesto de cinco carbonos con un grupo aldehído en cada extremo de la molécula. Los grupos aldehído reaccionan con los grupos amino de las proteínas y establecen enlaces cruzados entre las proteínas para formar una red insoluble. El osmio es un metal pesado que reacciona sobre todo con los ácidos grasos, lo que permite la preservación de las membranas celulares.

Una vez que el tejido se fija, el agua se retira mediante deshidratación en alcohol y los espacios hísticos se llenan con un material que soporta el corte del tejido. Las demandas de la microscopia electrónica incluyen que los cortes sean muy delgados. Los cortes en cera para el examen con el microscopio óptico rara vez son más delgados de 5 μm, mientras que los cortes para la microscopia electrónica convencional son mejores cuando tienen menos de 0.1 μm (equivalente en grosor a cerca de cuatro ribosomas).

Por lo general los tejidos que van a cortarse para la microscopia electrónica se impregnan en resinas epóxicas, como 1,4-butanediol-diglicidil-éter entre otras. Las secciones se cortan con el paso del bloque plástico sobre un borde cortante muy afilado (fig. 18-13) hecho de vidrio o una hoja de diamante finamente pulido. Los cortes obtenidos flotan en la superficie de un fondo de agua que se encuentra justo detrás del borde de la navaja. Los cortes se recogen luego con la rejilla metálica para especímenes y se secan sobre su superficie. Para teñir el tejido se deja que la rejilla flote sobre gotas de soluciones de metales pesados, en especial acetato de uranilo y citrato de plomo. Estos átomos de metales pesados se unen con las macromoléculas y brindan la densidad atómica necesaria para dispersar el rayo electrónico. Además de las tinciones estándar, los cortes de tejido pueden tratarse con anticuerpos marcados con metal u otros materiales que reaccionan con moléculas específicas en el corte de tejido. Los estudios con anticuerpo casi siempre se realizan en tejidos impregnados con resinas acrílicas, que resultan más permeables a las grandes moléculas que las resinas epóxicas.

Criofijación y uso de especímenes congelados Las células y los tejidos no tienen que fijarse con sustancias químicas e impregnarse con resinas plásticas para observarse con el

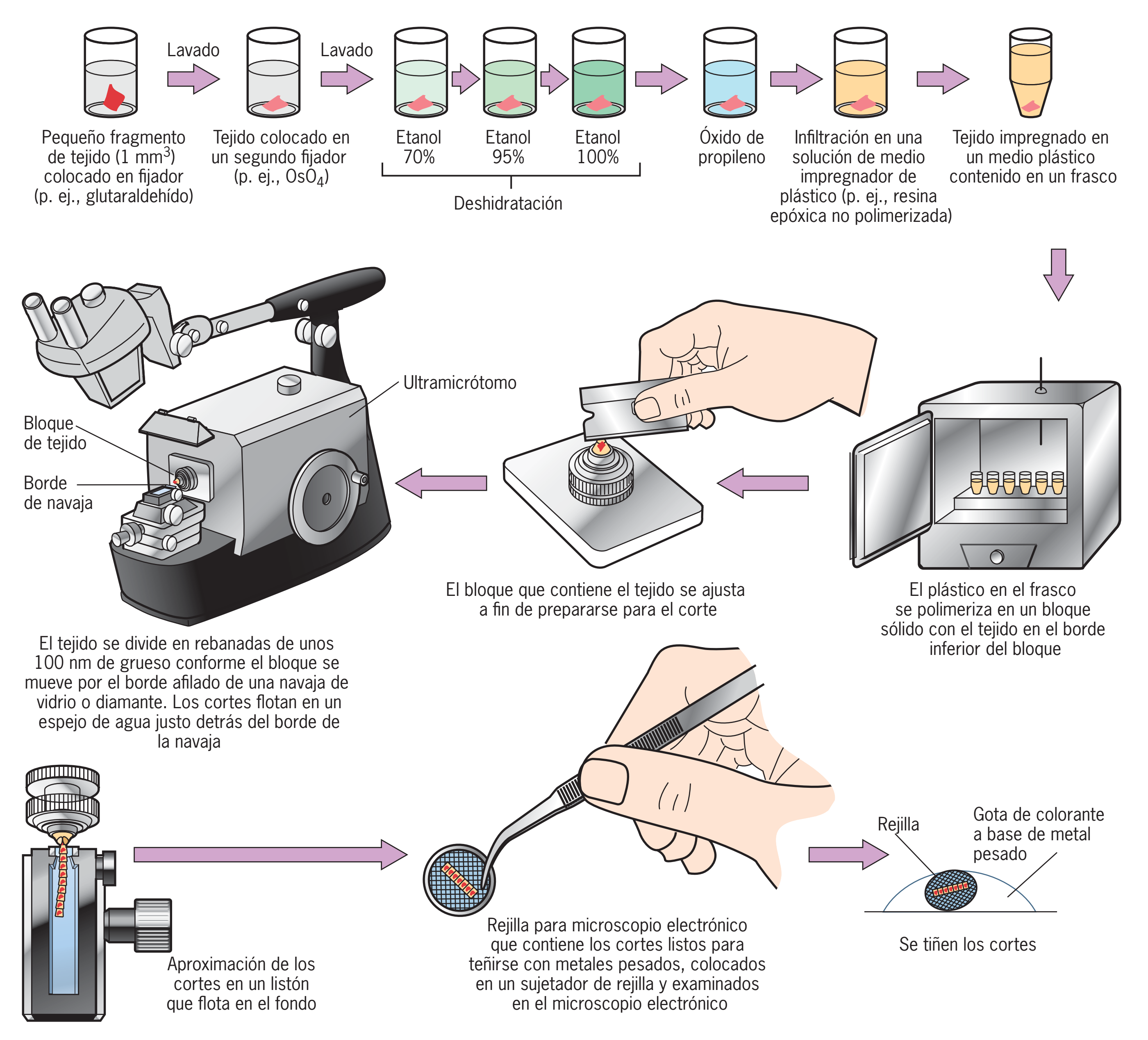


FIGURA 18-13 Preparación de un espécimen para observación en el microscopio electrónico.

microscopio electrónico. Una alternativa consiste en congelar con rapidez las células y los tejidos. Justo como un fijador químico detiene los procesos metabólicos y conserva la estructura biológica, lo mismo sucede con el congelamiento rápido, la *fijación en frío*. Como la fijación en frío alcanza estas metas sin alterar las macromoléculas celulares, es menos probable que se formen artefactos. La principal dificultad con la fijación en frío es la formación de cristales de hielo, que crecen hacia afuera desde sitios donde se forman sus núcleos. El cristal de hielo, conforme crece, destruye el frágil contenido de la célula en la que se forma. La mejor manera de evitar la formación de cristales de hielo es congelar la muestra con tanta rapidez que no haya tiempo para que los cristales se formen. Se dice que el agua que se congela en su estado líquido se "vitrifica". Varias técnicas se utilizan para alcanzar estas velocidades ultrarrápidas de congelación. Por ejemplo, los especímenes pequeños pueden sumergirse en líquidos a temperaturas muy bajas (como el propano líquido, cuyo punto de ebullición es de −42°C) o colocarse contra un bloque metálico que se enfrió antes con helio líquido (con punto de ebullición de −273°C). En cuanto a las muestras más grandes, es mejor tratarlas por congelamiento a alta presión. En esta técnica el espécimen se somete a una presión hidrostática elevada y se rocía con chorros de nitrógeno líquido. La presión alta disminuye el punto de congelación del agua, lo que reduce la velocidad de crecimiento de los cristales de hielo.

Aunque tal vez no se creería que un bloque congelado de tejido sea de gran utilidad para un microscopista, puede optarse por una cantidad sorprendente de estrategias para visualizar la estructura celular congelada en el microscopio óptico o en el electrónico. Por ejemplo, después de la preparación adecuada, un

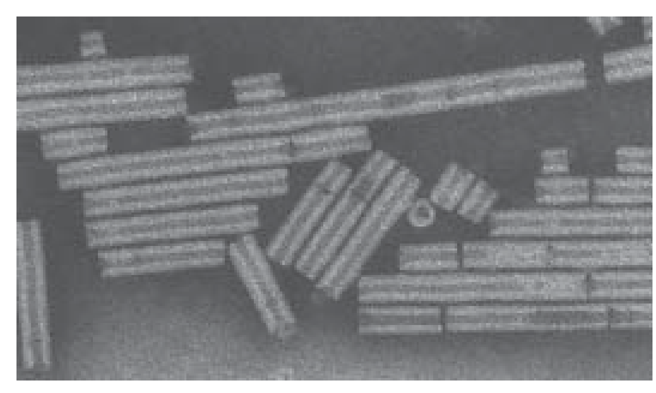
bloque congelado de tejido puede cortarse con un micrótomo especial en forma similar a un bloque de parafina o de plástico. Los cortes congelados son muy útiles para los estudios de enzimas, cuyas actividades tienden a perderse con los fijadores químicos. Como los cortes congelados pueden prepararse en mucho menos tiempo que los cortes en parafina o plástico, los patólogos los usan muchas veces para examinar con el microscopio óptico la estructura de los tejidos extirpados durante intervenciones quirúrgicas. Como resultado, la determinación de la malignidad o benignidad de un tumor puede hacerse mientras el paciente aún está en la mesa de operaciones.

No es necesario cortar las células congeladas para revelar su estructura interna. La figura 1-11 muestra una imagen de la región periférica delgada de una célula intacta que se arrastró sobre la superficie de una rejilla para microscopio electrónico un instante antes de ser congelada rápidamente. A diferencia de la micrografía electrónica estándar, la imagen de la figura 1-11 tiene una calidad tridimensional porque se generó por computadora en lugar de obtener la fotografía directa con una cámara. Para obtener la imagen, la computadora fusiona una gran cantidad de imágenes digitales bidimensionales de la célula que se capturan cuando el espécimen se inclina en ángulos definidos con respecto al trayecto del rayo electrónico. La reconstrucción tridimensional por computadora se conoce como *tomograma* y la técnica se denomina *tomografía crioelectrónica* (*crio-ET*).[2] La crio-ET revolucionó la forma en que pueden estudiarse las estructuras celulares nanométricas en células sometidas a congelación instantánea sin fijación, sin tinción y completamente hidratadas. La crio-ET y otros métodos computacionales de alta resolución constituyen un importante puente entre los mundos celular y molecular. Puede usarse una estrategia similar para generar estructuras tridimensionales de proteínas de membrana y macromoléculas purificadas (pág. 753). La figura 18-16 muestra otra técnica para visualizar la ultraestructura de tejido congelado que no requiere cortes.

Tinción negativa El microscopio electrónico también es adecuado para examinar partículas muy pequeñas, inclusive agregados de alto peso molecular como virus, ribosomas, enzimas con múltiples subunidades, elementos del citoesqueleto y complejos proteicos. También pueden resolverse las formas de proteínas individuales y ácidos nucleicos con el microscopio, siempre y cuando tengan el contraste suficiente con los elementos que los rodean. Una de las mejores formas para hacer visibles estas sustancias es emplear técnicas de **tinción negativa** en las que los depósitos de metales pesados se acumulan en toda la rejilla del espécimen, excepto donde hay partículas. Como resultado la muestra resalta en la pantalla por su brillantez relativa. La figura 18-14*a* presenta un ejemplo de un espécimen con tinción negativa.

Modelo de sombra Una técnica más para visualizar partículas aisladas consiste en hacer que los objetos proyecten sombras. La técnica se describe en la figura 18-15. Las rejillas que contie-

[2] En principio esta técnica es similar a la tomografía axial por computadora que emplea una multitud de imágenes de rayos X tomadas en ángulos diferentes del cuerpo para generar una imagen tridimensional. Por fortuna la maquinaria que se utiliza en la tomografía radiológica permite que la fuente de rayos X y el detector roten mientras el paciente permanece estacionario.



(a)

(b)

FIGURA 18-14 Ejemplos de especímenes con tinción negativa y sombras metálicas. Micrografía electrónica de un virus cascabel de tabaco después de la tinción negativa con fosfotungstato de potasio (*a*) o proyección de sombra con cromo (*b*). (CORTESÍA DE M. K. CORBETT.)

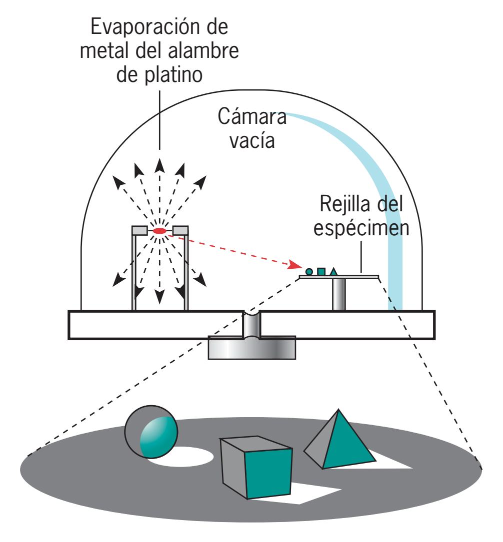


FIGURA 18-15 Procedimiento usado para la proyección de sombras como medio para dar contraste en el microscopio electrónico. A menudo este procedimiento se emplea para visualizar partículas pequeñas, como los virus que se muestran en la figura previa. Con frecuencia las moléculas de DNA y RNA se hacen visibles por una modificación de este procedimiento que se conoce como formación de sombras rotatorias, en el que el metal se evapora en un ángulo muy bajo mientras se gira el espécimen.

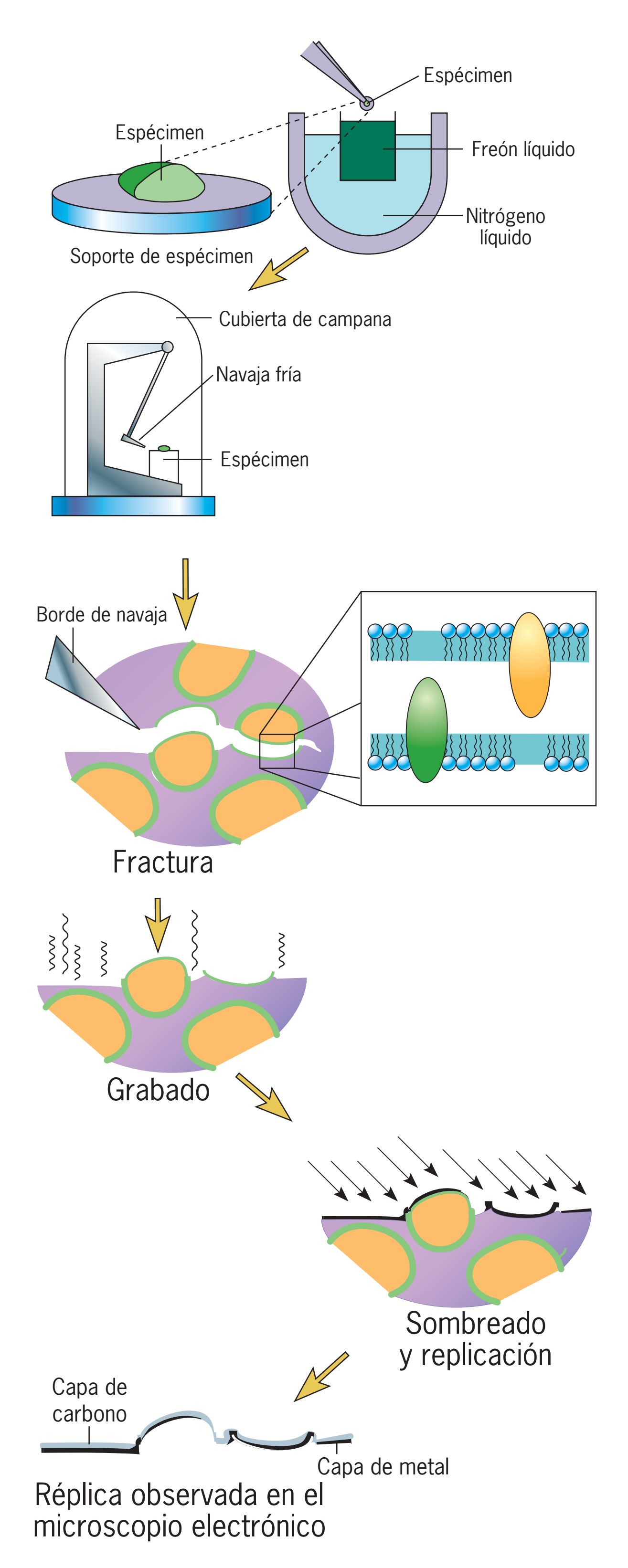


FIGURA 18-16 Procedimiento para la formación de réplicas por congelamiento y fractura como se describe en el texto. El procedimiento de congelamiento y grabado es un paso opcional en el que una capa delgada del hielo que cubre la muestra se evapora para revelar información adicional de la estructura de la superficie del espécimen fracturado.

nen los especímenes se colocan en una cámara sellada para vacío, que luego se evacua con una bomba de vacío. La cámara contiene un filamento formado por un metal pesado (casi siempre platino) junto con carbono. El filamento se calienta a temperaturas altas, lo que hace que se evapore y deposite una cubierta metálica sobre las superficies accesibles dentro de la cámara. Como resultado el metal se deposita en las superficies que quedan frente al filamento, mientras que las superficies opuestas de las partículas y el espacio en la rejilla que queda bajo su sombra quedan sin cubierta. Cuando la rejilla se observa en el microscopio electrónico, las áreas en sombra se ven brillantes en la pantalla, en tanto que las regiones cubiertas con metal se ven oscuras. Esta relación se invierte en la placa fotográfica, que es el negativo de la imagen. La convención para ilustrar especímenes sombreados es imprimir una imagen negativa en la que la partícula se vea iluminada por una luz blanca brillante (correspondiente a la superficie cubierta), con una sombra oscura proyectada por la partícula (fig. 18-14*b*). La técnica proporciona un contraste excelente para materiales aislados y produce un efecto tridimensional.

Replicación por congelamiento y fractura, y grabado por congelamiento Como ya se mencionó, varias técnicas de microscopia electrónica se adaptaron para trabajar con tejidos congelados. A menudo la ultraestructura de las células congeladas se observa con la técnica de **replicación por congelamiento y fractura**, que se ilustra en la figura 18-16. Se colocan pequeños fragmentos de tejido en un disco metálico pequeño y se congelan con rapidez. Luego el disco se monta sobre una placa fría dentro de una cámara de vacío y el bloque de tejido congelado se golpea con el borde de una navaja. El plano de fractura resultante se extiende desde el punto de contacto y divide el tejido en dos piezas, algo similar a la manera en que una hoja de hacha separa en dos un trozo de madera.

Considérese lo que podría pasar cuando un plano de fractura se extiende por una célula que contiene diversos organelos con distintas composiciones. Estas estructuras tienden a causar desviaciones en el plano de fractura, ya sea hacia arriba o abajo, lo que produce elevaciones, depresiones y crestas en la cara de fractura que reflejan los contornos del protoplasma atravesado. Por consiguiente las superficies expuestas por la fractura contienen información respecto al contenido de la célula. El objetivo es hacer visible esta información. El proceso de *replicación* se logra al usar la superficie de fractura como un molde en el que se deposita una capa de metal pesado. El metal pesado se deposita en la superficie nueva expuesta del tejido congelado en la misma cámara en la que se fracturó el tejido. El metal se deposita en un ángulo para producir sombras que acentúen la topografía local (fig. 18-17), como se describe en la sección previa referente a proyección de sombras.

Después se deposita una capa de carbono sobre el metal en forma perpendicular, en lugar de angulada, para formar una capa uniforme de carbono que pegue los parches de metal en una capa sólida. Una vez que el molde de la superficie se hizo, el tejido que constituyó el molde puede descongelarse, retirarse y desecharse; la **réplica** de metal-carbono es la que se coloca en la rejilla para espécimen y se visualiza en el microscopio electrónico. Las variaciones en el grosor del metal en las distintas partes de la réplica producen variaciones en la cantidad de electrones penetrantes que llegan a la pantalla de visualización, lo que pro-

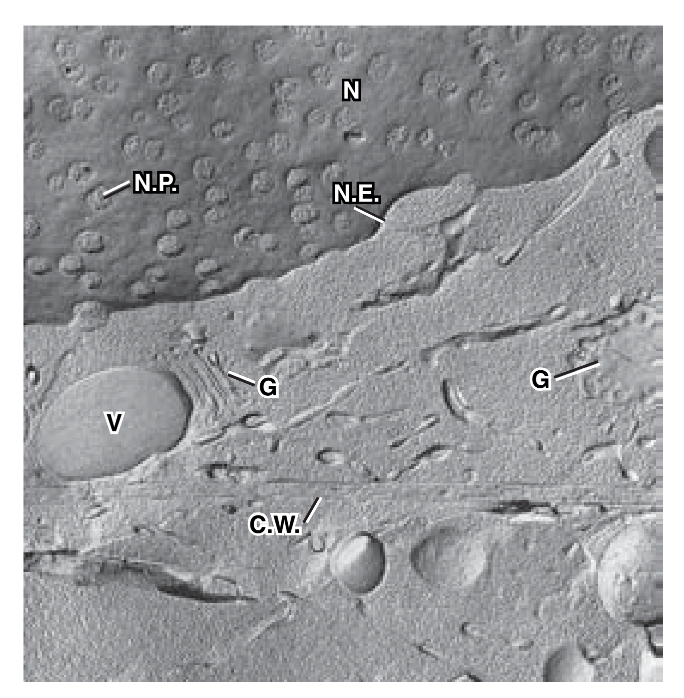


FIGURA 18-17 **Réplica de una célula de raíz de cebolla congelada y fracturada** que muestra la envoltura nuclear (N.E.) con sus poros nucleares (N.P.), el aparato de Golgi (G), una vacuola citoplásmica (V) y la pared celular (C.W.). (Cortesía de Daniel Branton.)

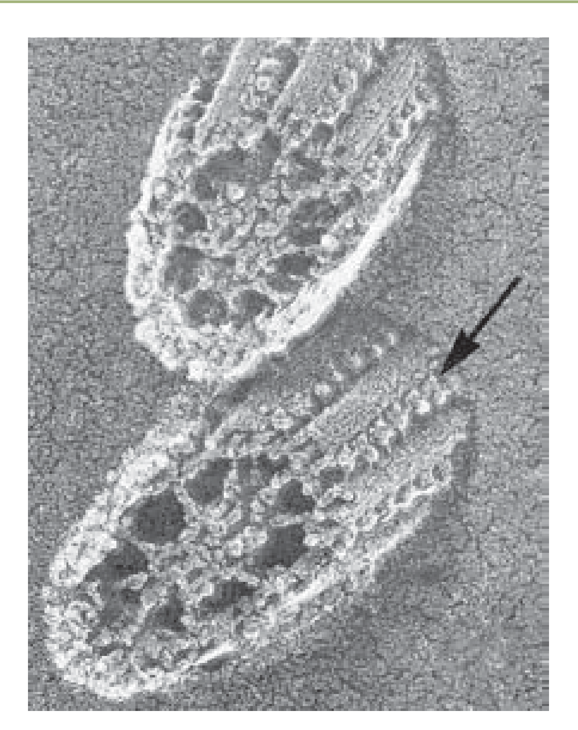


FIGURA 18-18 **Grabado profundo.** Micrografía electrónica de axonemas ciliares del protozoario *Tetrahymena*. Los axonemas se fijaron, congelaron y fracturaron, el agua congelada de la superficie del bloque fracturado se evaporó, lo que dejó una porción de los axonemas en relieve, como se visualiza en esta réplica metálica. La flecha indica una hilera distintiva de brazos de dineína. (Tomada de Ursula W. Goodenough y John E. Heuser, J Cell Biol 95:800, 1982. Mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

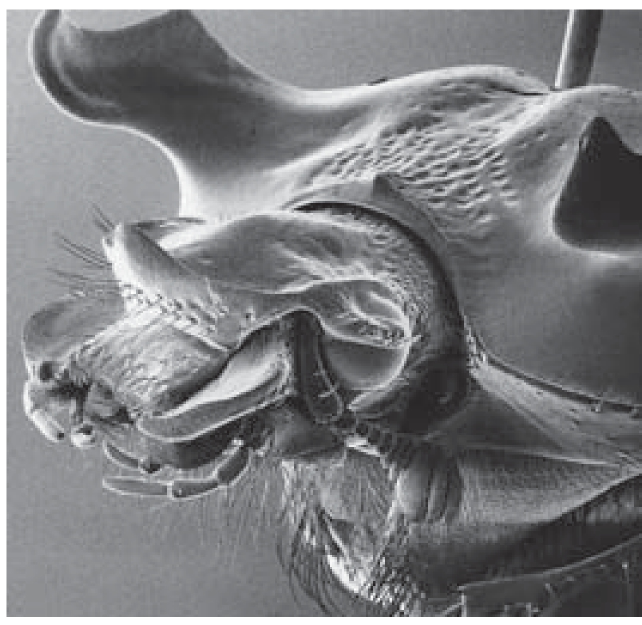
duce el contraste necesario en la imagen. Como se explica en el capítulo 4, los planos de fractura siguen el trayecto de menor resistencia por el bloque congelado, lo que a menudo los lleva por el centro de las membranas celulares. Por ello esta técnica es muy adecuada para examinar la distribución de las proteínas integrales de membrana en su trayecto por la bicapa lipídica (fig. 4-13). Tales estudios realizados por Daniel Branton y otros investigadores tuvieron una parte importante en la formulación de la estructura de mosaico fluido de las membranas a principios del decenio de 1970 (pág. 125).

La replicación por congelamiento y fractura por sí misma es una técnica en extremo valiosa, pero puede aportar aún más información si se incluye un paso llamado **grabado por congelamiento** (fig. 18-16). En este paso el espécimen congelado y fracturado que aún permanece dentro de la cámara fría se expone al vacío a una temperatura más alta por uno a unos cuantos minutos, durante los cuales puede evaporarse (sublimarse) una capa de hielo de la superficie expuesta. Luego de retirar parte del hielo, la superficie de la estructura puede cubrirse con metal pesado y carbono para crear una réplica metálica que revela tanto la superficie externa como la superficie interna de las membranas celulares. El desarrollo de las técnicas de *grabado profundo*, en las que se retiran mayores cantidades del hielo superficial, permitió obtener imágenes fascinantes de los organelos celulares. Las figuras 18-18, 8-38 y 9-45 presentan ejemplos de especímenes preparados con esta técnica en los que puede verse que las partes individuales de la célula sobresalen en relieve contra el fondo. La técnica brinda una resolución muy alta y puede usarse para revelar la estructura y la distribución de los complejos macromoleculares, como los del citoesqueleto, como se supone que existen dentro de la célula viva.

18.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

La microscopia electrónica de transmisión se explota más en el examen de la estructura interna de las células. En cambio, el microscopio electrónico de barrido (SEM) se emplea sobre todo para examinar las superficies de los objetos cuyo tamaño varía desde un virus hasta la cabeza de un animal (fig. 18-19). La construcción y la operación del SEM son muy diferentes a las del TEM. El objetivo de la preparación del espécimen para el SEM es producir un objeto que tenga las mismas propiedades de forma y superficie que en el estado vivo, pero que carezca de líquido, ya que esto es necesario para observar el espécimen al vacío. Como el agua constituye un porcentaje muy alto del peso de las células vivas y se encuentra relacionada con todas las macromoléculas, su extracción puede tener un efecto muy destructivo en la estructura celular. Cuando las células sólo se secan al aire, la destrucción se debe sobre todo a la tensión superficial en las interfases agua-aire. Las muestras que se examinarán con el SEM se fijan, se pasan por una serie de alcoholes y luego se secan en un proceso de *secado de punto crítico.* El secado de punto crítico ofrece la ventaja de que cada solvente tiene una temperatura y una presión críticas en las que la densidad del vapor es igual a la densidad del líquido. En este punto no hay tensión superficial entre el gas y el líquido. El solvente de las células se sustituye con un líquido de transición (por lo general

(a)



(b)

FIGURA 18-19 **Microscopia electrónica de barrido.** Micrografías electrónicas de barrido de (*a*) un bacteriófago T4 (×275 000) y (*b*) la cabeza de un insecto (×40). (*A*, reimpresa con autorización de A. N. Broers, B. J. Panessa y J. F. Gennaro, Science 189:635, 1975; © 1975, American Association for the Advancement of Science; *B*, cortesía de H. F. Howden y L. E. C. Ling.)

dióxido de carbono), que se vaporiza a presión para que las células no se expongan a ninguna tensión superficial que pudiera distorsionar su configuración tridimensional.

Una vez que el espécimen se seca, se cubre con una capa delgada de metal, lo que lo convierte en un blanco adecuado para un rayo de electrones. En el microscopio electrónico de transición, el rayo de electrones se enfoca mediante las lentes del condensador para iluminar al mismo tiempo todo el campo de visión. En el microscopio electrónico de barrido, los electrones se aceleran en un rayo fino que barre la muestra. En el TEM, los electrones pasan por el espécimen para formar una imagen. En el SEM, la imagen se forma con los electrones que se reflejan desde el espécimen (se dispersan de regreso) o con los electrones secundarios que la muestra emite después de ser golpeada por el rayo electrónico primario. Estos electrones golpean un detector que se localiza cerca de la superficie del espécimen.

La formación de la imagen en el SEM es indirecta. Además del rayo que explora la superficie del espécimen, otro rayo electrónico explora al mismo tiempo la cara de un tubo de rayos catódicos y produce una imagen similar a la que se ve en una pantalla de televisión. Los electrones que rebotan de la muestra y llegan al detector controlan la fuerza del rayo en el tubo de rayos catódicos. Mientras más electrones se recolecten de la muestra en un punto determinado, más fuerte es la señal para el tubo y mayor la intensidad del rayo en la pantalla en el punto correspondiente. El resultado es una imagen en la pantalla que refleja la topología superficial de la muestra porque es su topología (grietas, colinas y orificios) lo que determina el número de electrones reunidos de las diversas partes de la superficie.

Como resulta evidente en las fotografías de la figura 18-19, un SEM puede proveer un alto grado de magnificación (desde cerca de 15 hasta 150 000 veces la de un instrumento estándar). El poder de resolución de un SEM depende del diámetro del rayo electrónico. Los modelos más nuevos son capaces de alcanzar resoluciones menores de 5 nm, que se emplean para localizar anticuerpos marcados con oro unidos con la superficie celular. El SEM también proporciona una profundidad de enfoque notable, unas 500 veces más que el microscopio óptico con una magnificación correspondiente. Esta propiedad hace que el SEM tenga imágenes de calidad tridimensional. A nivel celular, el SEM permite al observador apreciar la estructura de la superficie externa de las células y todos los procesos, extensiones y materiales extracelulares diversos que interactúan con el ambiente.

Microscopia de fuerza atómica

Aunque no es electrónico, el **microscopio de fuerza atómica** (*atomic force microscope*, **AFM**) es un instrumento de barrido de alta resolución cada vez más importante en nanotecnología y biología molecular. En el texto se presentan varias imágenes obtenidas por AFM: las figuras 4-23*a*, 5-24, 7-32*c*, y la capitular del capítulo 12. El AFM barre con una sonda fina la superficie del espécimen. Conectada a la sonda se encuentra una

diminuta "viga" (o viga en voladizo) que es desplazada por variaciones en la topografía del espécimen de modo que el grado de desplazamiento se correlaciona con diferencias en la altura de porciones del espécimen. El instrumento genera un mapa a nanoescala del desplazamiento, que se traduce en una imagen topográfica tridimensional de la superficie del espécimen. A diferencia de otras técnicas para determinar la estructura molecular, como cristalografía de rayos X y crio-EM, que promedian la estructura de muchas moléculas individuales, la AFM proporciona una imagen de cada molécula individual con su orientación en el campo (véase fig. 5-24).

18.4 EL USO DE RADIOISÓTOPOS

Un rastreador es una sustancia que revela su presencia de una forma u otra y por tanto puede localizarse o vigilarse durante el curso de un experimento. Según la sustancia y el tipo de experimento, un rastreador puede marcarse con fluorescencia, con giro, densidad o radiación. En cada caso un grupo marcado permite detectar una molécula sin afectar la especificidad de sus interacciones. Por ejemplo, las moléculas radiactivas participan en las mismas reacciones que las no radiactivas, pero su localización puede seguirse y es posible medir la cantidad presente.

La identidad de un átomo (ya sea de hierro, cloro o de algún otro elemento) y sus propiedades químicas se identifican mediante el número de protones que hay en su núcleo. Todos los átomos de hidrógeno tienen un solo protón, todos los de helio poseen dos, todos los de litio tienen tres, etc. Sin embargo, no todos los átomos de hidrógeno, helio o litio albergan la misma cantidad de neutrones. Se dice que los átomos con el mismo número de protones y distinta cantidad de neutrones son *isótopos* uno del otro. Aun el hidrógeno, el más sencillo de los elementos, puede existir como tres isótopos distintos, según la presencia de cero, uno o dos neutrones en el núcleo del átomo. De estos tres isótopos de hidrógeno, sólo el que contiene dos neutrones es radiactivo; se trata del tritio (^{3}H).

Los isótopos son radiactivos cuando contienen una combinación inestable de protones y neutrones. Los átomos que son inestables tienden a romperse o desintegrarse, con lo que alcanzan una configuración más estable. Cuando un átomo se desintegra, libera partículas o radiación electromagnética que puede vigilarse con los instrumentos apropiados. Los isótopos radiactivos se encuentran en toda la tabla periódica de los elementos y pueden producirse en el laboratorio a partir de elementos no radiactivos. Muchas moléculas biológicas pueden obtenerse en estado radiactivo, o sea, con uno o más átomos radiactivos como parte de su estructura.

La **vida media ($T_{1/2}$)** de un radioisótopo es una medida de su inestabilidad. Entre más inestable sea un isótopo particular, mayor es la probabilidad de que un átomo determinado se desintegre en un tiempo específico. Si se comienza con un curio[3] de tritio, la mitad de esa cantidad de material radiactivo quedará después de unos 12 años (que es la vida media de este radioisótopo). Durante los primeros años de la investigación de la fotosíntesis y otras vías metabólicas el único isótopo del carbono disponible era ^{11}C, cuya vida media es cercana a 20 min. Los experimentos con ^{11}C se realizaban con mucha prisa para poder medir la cantidad de isótopo incorporado antes que la sustancia desapareciera. La disponibilidad del ^{14}C en el decenio de 1950, un radioisótopo con una vida media de 5 700 años, se recibió con gran celebración. Los radioisótopos de mayor importancia en la investigación biológica celular se listan en el cuadro 18-1, junto con la información de su vida media y la naturaleza de su radiación.

Cuadro 18-1 Propiedades de varios radioisótopos que se utilizan a menudo en la investigación biológica

Símbolo y peso atómico	Vida media	Tipo de partícula(s) emitida(s)
^{3}H	12.3 años	Beta
^{11}C	20 min	Beta
^{14}C	5 700 años	Beta
^{24}Na	15.1 h	Beta, gamma
^{32}P	14.3 d	Beta
^{35}S	87.1 d	Beta
^{42}K	12.4 h	Beta, gamma
^{45}Ca	152 d	Beta
^{59}Fe	45 d	Beta, gamma
^{60}Co	5.3 años	Beta, gamma
^{64}Cu	12.8 h	Beta, gamma
^{65}Zn	250 d	Beta, gamma
^{131}I	8.0 d	Beta, gamma

Los átomos liberan tres formas principales de radiación durante su desintegración. Es posible que el átomo libere una *partícula alfa*, que consiste en dos protones y dos neutrones, y es equivalente al núcleo de un átomo de helio; una *partícula beta*, que equivale a un electrón, además puede existir *radiación gamma*, que consiste en radiación electromagnética o fotones. Los isótopos más usuales son los emisores beta, que se vigilan mediante una de dos metodologías diferentes: espectrometría líquida por centelleo o autorradiografía.

La *espectrometría por centelleo en líquido* se usa para medir la cantidad de radiactividad en una muestra dada. Esta técnica se basa en la propiedad de ciertas moléculas, llamadas *fosforescentes* o *centelleantes*, de absorber parte de la energía de una partícula emitida y liberarla en la forma de luz. Al preparar una muestra para conteo por centelleo en líquido se mezcla la muestra con una solución de la sustancia fosforescente en una ampolleta de centelleo de vidrio o plástico. Esto coloca al material fosforescente y el isótopo radiactivo en contacto muy estrecho, de modo que incluso los emisores beta más débiles pueden medirse de manera eficiente. Una vez hecha la mezcla, la ampolleta se coloca en el instrumento de conteo, donde se hace descender en un pozo cuyas paredes contienen un fotodetector extremadamente sensible. Cuando los átomos radiactivos contenidos en la ampolleta se desintegran, las partículas emitidas activan las moléculas fosforescentes, que emiten destellos de luz. Ésta es detectada por una fotocelda y la señal se amplifica en un tubo fotomultiplicador dentro del contador. Después de corregir tomando en cuenta el ruido de fondo, la cantidad de radiactividad presente en cada ampolleta se exhibe en una gráfica.

La **autorradiografía** es una técnica muy amplia que se emplea para localizar los sitios que contienen un isótopo especí-

[3] Un curio es la cantidad de radiactividad necesaria para causar 3.7×10^{10} desintegraciones por segundo.

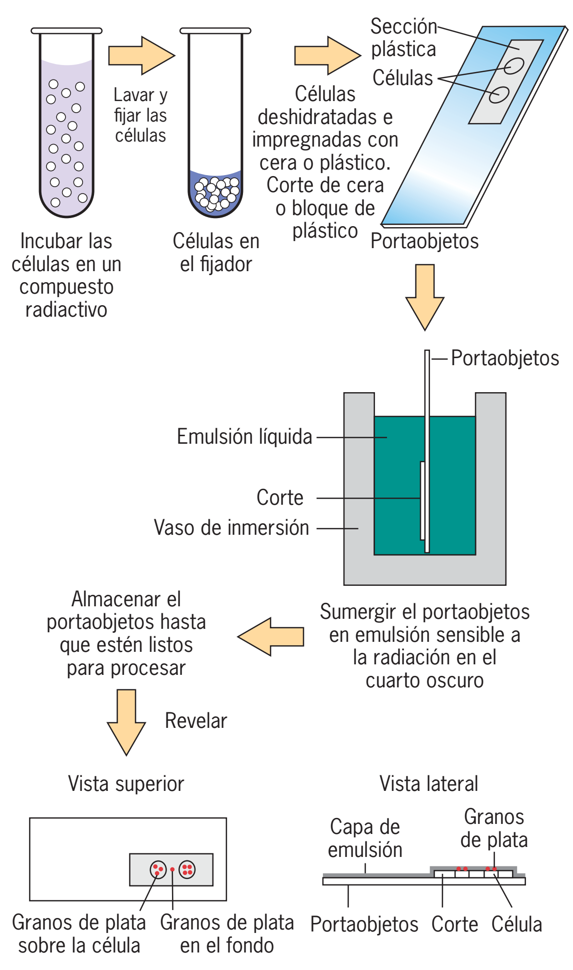
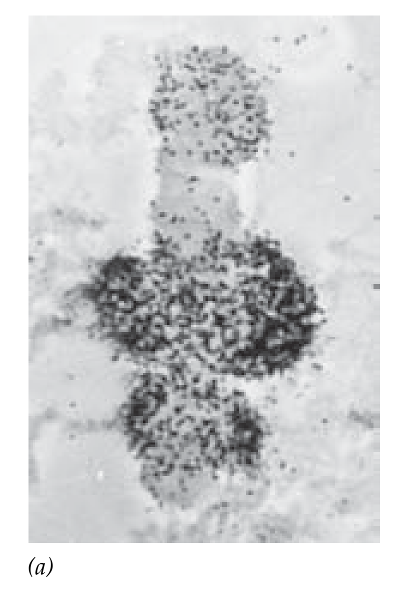


FIGURA 18-20 Procedimiento paso a paso para la preparación de una autorradiografía.

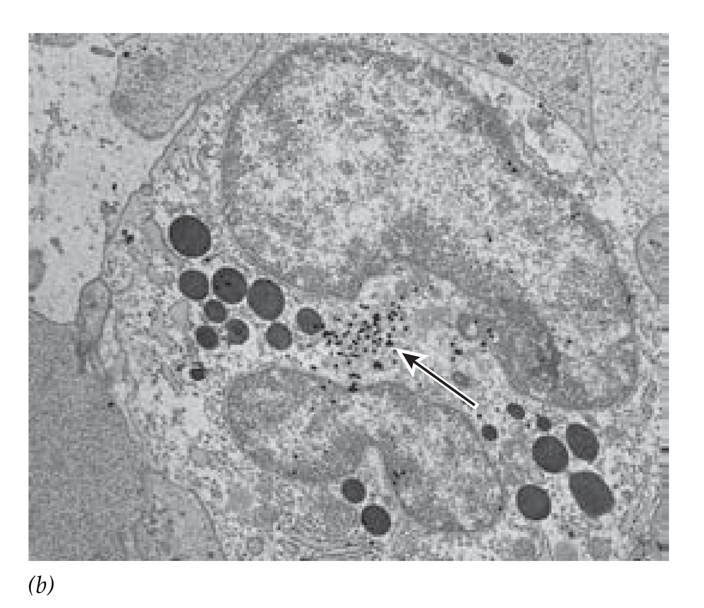
fico, ya sea en una célula, un gel de poliacrilamida o un filtro de nitrocelulosa. Los experimentos de pulso y seguimiento que se presentan en la página 277 describen la importancia de la autorradiografía en los descubrimientos iniciales de las actividades sintéticas de las células. La autorradiografía aprovecha la capacidad de una partícula emitida de un átomo radiactivo para activar una emulsión fotográfica, muy similar a la luz o los rayos X que activan la emulsión que cubre un fragmento de película. Si la emulsión fotográfica se pone en contacto con una fuente radiactiva, las partículas emitidas por la fuente dejan granos de plata negros y diminutos en la emulsión después del revelado fotográfico. La autorradiografía se usa para localizar radioisótopos dentro de cortes de tejidos que se inmovilizaron en una laminilla o una rejilla para el microscopio electrónico de transmisión. Los pasos de la preparación de una autorradiografía microscópica óptica se muestran en la figura 18-20. La emulsión se aplica a los cortes en la laminilla o la rejilla a manera de capa muy delgada y el espécimen se coloca en un recipiente a prueba de luz para permitir que la emulsión se exponga por las emisiones. La cantidad de granos de plata que se forman es mayor entre más tiempo permanece el espécimen antes del revelado. Cuando la laminilla o rejilla revelada se examina al microscopio, la localización de los granos de plata en la capa de emulsión que cubre el tejido indica la localización de la radiactividad en las células subyacentes (fig. 18-21).

18.5 CULTIVO CELULAR

En todo este libro se ha recalcado la técnica de la biología celular con la que se intenta comprender procesos particulares mediante el análisis en un sistema in vitro simplificado y controlado. La misma estrategia puede aplicarse al estudio de las células porque también pueden extraerse de las influencias a las que están sujetas dentro de un organismo multicelular complejo.



(a)



(b)

FIGURA 18-21 Ejemplos de autorradiografía microscópica óptica y electrónica. *a*) Autorradiografía microscópica óptica de un cromosoma del politeno del insecto *Chironomus*, que muestra la incorporación extensa de [^{3}H]uridina en el RNA en las regiones purificadas del cromosoma. Las autorradiografías de este tipo confirmaron que los penachos de los cromosomas son sitios de transcripción. Esta micrografía puede compararse con la de la figura 10-8*b*, que muestra el mismo cromosoma como se observa en el microscopio electrónico de barrido. *b*) Autorradiografía microscópica electrónica de una célula de médula ósea incubada en [^{35}S]O_4 durante 5 min y fijada de inmediato. La incorporación de sulfato, (revelada por los pequeños granos negros de plata), se localiza en el aparato de Golgi (flecha). (*A*, TOMADA DE C. PELLING, CHROMOSOMA 15:98, 1964; *B*, TOMADA DE R. W. YOUNG, J CELL BIOL 57:177, 1973; MEDIANTE AUTORIZACIÓN DE DERECHOS DE LA ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS.)

El aprendizaje de cómo **cultivar células** fuera de un organismo es uno de los logros técnicos más valiosos en todo el estudio de la biología. Un vistazo a cualquier publicación de biología celular revela que la mayoría de los artículos describen investigaciones realizadas en células cultivadas. Las razones de esto son muchas: las células cultivadas pueden obtenerse en grandes cantidades; casi todos los cultivos contienen sólo un tipo de célula; muchas actividades celulares distintas, como la endocitosis, el movimiento celular, la división celular, el tráfico de membrana y la síntesis de macromoléculas, pueden estudiarse en un cultivo celular; las células pueden diferenciarse en un cultivo, y las células cultivadas responden al tratamiento con fármacos, hormonas, factores de crecimiento y otras sustancias activas.

Los primeros investigadores en cultivar células empleaban medios que contenían una gran variedad de sustancias desconocidas. El crecimiento celular se lograba con la adición de líquidos obtenidos de sistemas vivos, como linfa, suero sanguíneo, u homogeneizados de embrión. Se descubrió que las células necesitaban una variedad considerable de nutrimentos, hormonas, factores de crecimiento y cofactores para mantenerse sanas y proliferar. Aun ahora la mayoría de los medios de cultivo contienen grandes cantidades de suero. La importancia del suero (o los factores de crecimiento que contiene) en la proliferación de células cultivadas se muestra en las curvas de crecimiento celular de la figura 16-4.

Uno de los principales objetivos de los cultivadores de células es desarrollar medios definidos libres de suero que mantengan el crecimiento de las células. Con un abordaje pragmático en el que se prueban combinaciones de varios ingredientes para comprobar su capacidad para sostener el crecimiento y la proliferación celulares, cada vez se cultivan con éxito más células en medios "artificiales" que carecen de suero u otros líquidos naturales. Como era de esperarse, la composición de estos medios químicos es relativamente compleja; consiste en una mezcla de nutrimentos y vitaminas, junto con diversas proteínas purificadas que incluyen insulina, factor de crecimiento epidérmico y transferrina (que proporciona hierro a la célula).

Como son tan ricos en nutrimentos, los medios para cultivo celular son un hábitat que invita al crecimiento de microorganismos. A fin de prevenir la contaminación bacteriana de los cultivos celulares, los expertos cultivadores de tejido deben tomar medidas muy estrictas para mantener las condiciones estériles en su espacio de trabajo. Esto se logra con el uso de guantes estériles y la esterilización de todos los suministros y equipo, con el empleo de niveles bajos de antibióticos en los medios, además de la realización de las actividades bajo una campana estéril.

El primer paso en el cultivo celular es la obtención de células. En la mayoría de los casos sólo debe extraerse una ampolleta de células congeladas cultivadas con anterioridad de un tanque de nitrógeno líquido, descongelar la ampolleta y transferir las células al medio de espera. Un cultivo de este tipo se conoce como **cultivo secundario** porque las células provienen de un cultivo previo. En un **cultivo primario** las células se obtienen del organismo. Casi todos los cultivos primarios de células animales se toman de embriones, cuyos tejidos se disocian con más facilidad en células que los tejidos de los adultos. La disociación se efectúa con la ayuda de una enzima proteolítica, como la tripsina, que digiere los dominios extracelulares de las proteínas que median la adhesión celular (cap. 7). Luego el tejido se lava para eliminar la enzima y por lo general se suspende en una solución salina que carece de iones Ca^{2+} y contiene una sustancia, como tetraacetato de etilenediamina (EDTA), que se une (quela) con los iones de calcio. Como se explicó en el capítulo 7, los iones de calcio desempeñan una función clave en la adhesión celular y su eliminación de los tejidos facilita mucho la separación de las células.

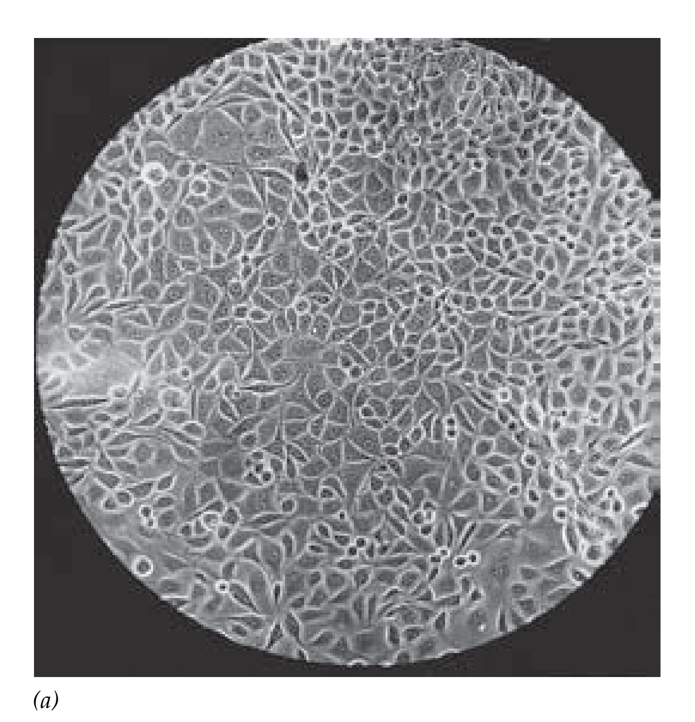
Una vez que las células se prepararon, pueden iniciarse dos tipos básicos de cultivos celulares. En un **cultivo de masa**, una cantidad más o menos grande de células se agrega a una caja de cultivo; se asientan y unen al fondo para formar una capa relativamente uniforme de células. Las células que sobreviven crecen y se dividen y, tras varias generaciones, forman una monocapa que cubre el fondo de la caja (fig. 18-22*a*). En un **cultivo clonal** se agrega una cantidad hasta cierto punto pequeña de células a la caja para que cada célula esté a cierta distancia de sus vecinas. En estas condiciones cada célula sobreviviente prolifera para formar una colonia o clon separado (fig. 18-22*b*) cuyos miembros provienen de la misma célula original.

Las células normales (no malignas) pueden dividirse una cantidad limitada de veces (por lo general 50 a 100) antes de envejecer y morir (pág. 505). Por ello muchas de las células que suelen usarse en los estudios con cultivo de tejido se someten a modificaciones genéticas que les permiten crecer por tiempo indefinido. Las células de este tipo se conocen como **línea celular** y casi siempre crecen para formar tumores malignos cuando se inyectan en animales de laboratorio susceptibles. La frecuencia con la que una célula normal que crece en cultivo se transforma de manera espontánea en una línea celular depende del organismo del que proviene. Por ejemplo, las células de ratón se transforman con una frecuencia más o menos alta; las células humanas se transforman sólo raras veces, si es que sucede. Las líneas celulares humanas (p. ej., células HeLa) suelen derivarse de tumores humanos o de células tratadas con virus o sustancias que causan cáncer.

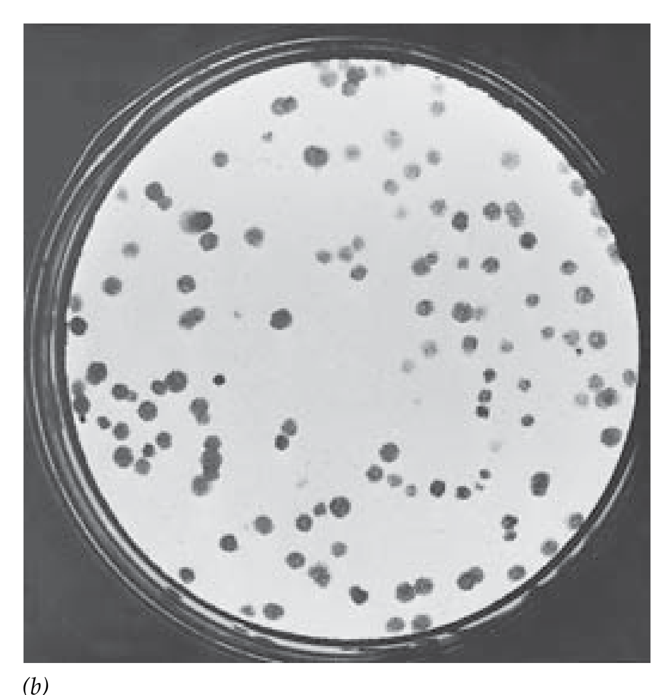
Muchos tipos distintos de plantas también pueden crecer en cultivo. En una técnica, las células vegetales se tratan con la enzima celulasa, que digiere la pared celular y libera la célula desnuda o **protoplasto**. Entonces los protoplastos pueden cultivarse en un medio químico definido que promueve su crecimiento y división. En condiciones adecuadas las células pueden crecer en un cúmulo indiferenciado de células llamado *callo*, en el que es posible inducir el desarrollo de brotes de los que la planta puede regenerarse. En una técnica alternativa, con tratamiento hormonal puede hacerse que las células del tejido de la hoja pierdan sus propiedades diferenciadas y se transformen en material de callo. El callo puede transferirse después a un medio líquido para iniciar un cultivo celular.

18.6 FRACCIONAMIENTO DEL CONTENIDO DE UNA CÉLULA MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN DIFERENCIAL

La mayoría de las células contienen una variedad de organelos distintos. Si se pretende estudiar una función particular de las mitocondrias o aislar una enzima particular del aparato de Golgi, es conveniente aislar primero el organelo relevante en estado purificado. El aislamiento de un organelo particular en



(a)



(b)

FIGURA 18-22 Dos tipos de cultivos celulares. *a*) Micrografía óptica que muestra una pequeña porción de un cultivo masivo de células L de ratón que crecen en la superficie de una caja de cultivo en un medio químico. *b*) Micrografía de bajo poder de colonias diseminadas sobre la superficie de una caja de cultivo. En este cultivo clonal, cada colonia contiene células que son descendientes de una sola célula original. Este cultivo se inició con la adición de sólo unas 100 células a la caja. (CORTESÍA DE CHARITY WAYMOUTH.)

gran cantidad suele lograrse mediante la técnica de **centrifugación diferencial**, que depende del principio de que, en tanto sean más densas que el medio circundante, las partículas de diferente tamaño y forma viajan hacia el fondo de un tubo centrifugado a distintas velocidades cuando se colocan en un campo de centrifugación.

Para efectuar esta técnica se procede primero a la rotura mecánica de las células con un *homogeneizador* mecánico. Las células se homogeneizan en una solución amortiguada isotónica (que a menudo contiene sacarosa), lo que previene la rotura de las vesículas de membrana por ósmosis. El homogeneizado se somete a una serie de centrifugaciones secuenciales cada vez con mayor fuerza centrífuga. Los pasos de esta técnica se explican en el capítulo 8 y se ilustran en la figura 8-5. Al principio el homogeneizado se somete a fuerzas centrífugas bajas por un periodo corto para que sólo los organelos celulares más grandes, como los núcleos (y cualquier célula completa remanente), se sedimenten en una pelotilla. Los organelos citoplásmicos relativamente grandes (mitocondrias, cloroplastos, lisosomas y peroxisomas) pueden separarse de la suspensión con fuerzas centrífugas mayores (fig. 8-5). Los microsomas (los fragmentos de membranas vacuolares y reticulares del citosol) y los ribosomas de la suspensión se retiran en los pasos subsiguientes. Este último paso requiere la ultracentrífuga, que puede generar velocidades de 75 000 revoluciones por minuto que producen fuerzas equivalentes a 500 000 veces la gravedad. Una vez que los ribosomas se retiran, el sobrenadante consiste en la fase soluble de la célula y las partículas demasiado pequeñas para retirarse por sedimentación.

Puesto que los pasos iniciales de la centrifugación diferencial no producen preparaciones puras de un organelo particular, casi siempre se requieren pasos adicionales. En muchos casos se logra una purificación adicional mediante centrifugación de una de las fracciones a través de un gradiente de densidad, como se observa en la figura 18-23, lo que distribuye el contenido de la muestra en varias capas de acuerdo con su densidad. La composición de varias fracciones puede determinarse con el examen microscópico o la medición de las cantidades de proteínas particulares conocidas como específicas de organelos particulares.

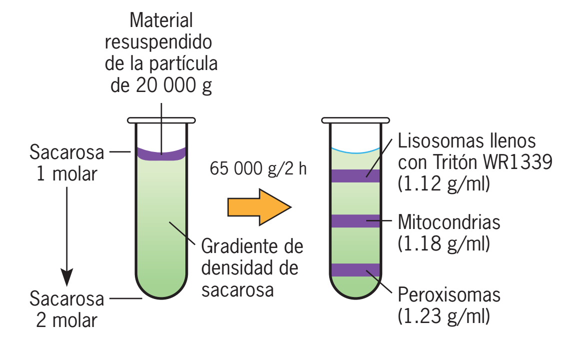


FIGURA 18-23 Purificación de fracciones subcelulares por centrifugación de equilibrio de gradiente de densidad. En este ejemplo particular, el medio se compone de un gradiente de densidad continuo de sacarosa y los distintos organelos se sedimentan hasta que llegan a un sitio en el tubo igual a su propia densidad, donde forman bandas. La partícula de 20 000 g se obtiene como se muestra en la figura 8-5.

Los organelos celulares aislados por centrifugación diferencial conservan un nivel notable de actividad normal, siempre que no se expongan a condiciones desnaturalizantes durante el aislamiento. Los organelos aislados por este procedimiento pueden usarse en *sistemas libres de células* para estudiar una gran variedad de actividades celulares, entre ellas la síntesis de proteínas unidas con la membrana (pág. 280), la formación de vesículas cubiertas (véase figura 8-6) y el transporte de solutos y el desarrollo de gradientes iónicos (véase figura 5-25*a*).

18.7 AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS

En el curso de este libro se consideran las propiedades de muchas proteínas. La proteína debe aislarse en un estado relativamente puro antes de poder obtener información de la estructura o la función de una proteína particular. Como la mayoría de las células contienen miles de proteínas diferentes, la purificación de una sola especie puede ser todo un desafío, en especial si la proteína se encuentra en baja concentración en la célula. En esta sección se revisan de manera breve sólo algunas de las técnicas empleadas para purificar las proteínas.

Por lo general la purificación de una proteína se realiza mediante la eliminación de los contaminantes por pasos. Es posible que dos proteínas sean muy similares en cuanto a una propiedad, como la carga general, y muy distintas en otra, como el tamaño o la forma molecular. Por consiguiente, la purificación completa de una proteína determinada suele requerir el uso de técnicas sucesivas que aprovechan las diferentes propiedades de las proteínas que se separan. La purificación se mide como un incremento en la **actividad específica**, que es el índice entre la cantidad de esa proteína y el total de proteína presente en la muestra. Debe emplearse algún rasgo identificable de la proteína específica como **prueba** para identificar la cantidad relativa de esa proteína en la muestra. Si la proteína es una enzima, puede recurrirse a su actividad catalítica como prueba para vigilar la purificación. Una alternativa consiste en basar las pruebas en criterios inmunológicos, electroforéticos, microscópicos electrónicos u otros. Las mediciones de la proteína total en una muestra pueden hacerse con varias propiedades, inclusive el nitrógeno total, que puede medirse con gran precisión y es bastante constante en cerca de 16% del peso seco de todas las proteínas.

Precipitación selectiva

El primer paso en la purificación selectiva debe ser uno que pueda realizarse en una preparación muy impura y pueda producir un gran aumento en la actividad específica. Por lo general el primer paso aprovecha las diferencias en la solubilidad entre las proteínas mediante la precipitación selectiva de la proteína deseada. Las propiedades de solubilidad de una proteína dependen mucho de la distribución de cadenas laterales hidrófilas e hidrófobas en su superficie. La solubilidad de una proteína en una solución determinada depende de un equilibrio relativo entre las interacciones proteína-solvente que la mantienen en solución y de las interacciones proteína-proteína que hacen que se agregue y precipite de la solución. La sal que más se utiliza para la precipitación selectiva de proteínas es el sulfato de amonio, que es muy soluble en agua y tiene una gran fuerza iónica. La purificación se logra mediante la adición gradual de una solución saturada de sulfato de amonio al extracto crudo de proteína. Conforme la adición de la sal continúa, la precipitación de las proteínas contaminantes aumenta y el precipitado puede desecharse. Al final se alcanza un punto en el que la proteína que se busca se separa de la solución. Este punto se reconoce por la pérdida de actividad en la fracción soluble cuando se prueba con el ensayo particular que se utilice. Una vez que la proteína deseada se precipita, las proteínas contaminantes se dejan en la solución, mientras que la proteína buscada puede disolverse de nuevo.

Cromatografía líquida de columna

Cromatografía es un término que designa varias técnicas en las que una mezcla de componentes disueltos se fracciona a su paso por cierto tipo de matriz porosa. En las técnicas de cromatografía líquida, los componentes en una mezcla pueden relacionarse con una de dos fases alternativas: una fase móvil, consistente en un solvente en movimiento, y una fase inmóvil, que es la matriz a través de la cual se mueve el solvente.[4] La fase inmóvil de los procedimientos cromatográficos que se describen más adelante consiste en materiales que se empacan en una columna. Las proteínas que van a fraccionarse se disuelven en un solvente y luego se pasan por la columna. Los materiales que conforman la fase inmóvil contienen sitios a los que las proteínas en solución pueden unirse. Conforme las moléculas de proteína individual interactúan con los materiales de la matriz, su progreso por la columna se retrasa. Por tanto, mientras mayor sea la afinidad de una proteína particular por el material de la matriz, su paso por la columna es más lento. Como las diferentes proteínas de la mezcla tienen distinta afinidad por la matriz, se retrasan en diferente medida. Conforme el solvente pasa por la columna y gotea del fondo, se recolecta como *fracciones* en una serie de tubos. Las proteínas en la mezcla con la menor afinidad por la columna aparecen en las primeras fracciones que salen de la columna. La resolución de muchos procedimientos cromatográficos mejoró en los últimos años gracias al desarrollo de la *cromatografía líquida de alto desempeño* (*HPLC*), en la que se usan columnas largas y delgadas, y la fase móvil se obliga a pasar por una matriz apretada no compresible que está sometida a alta presión.

Cromatografía de intercambio iónico Las proteínas son electrólitos polivalentes grandes y es improbable que muchas proteínas en una preparación de pureza parcial tengan la misma carga general. La carga iónica se usa como base para la purificación en diversas técnicas, inclusive la **cromatografía de intercambio iónico**. La carga general de una proteína es la suma de todas las cargas individuales de sus aminoácidos componentes. Como la carga de cada aminoácido depende del pH del medio (véase fig. 2-27), la carga de cada proteína también depende del

[4] La cromatografía líquida se distingue de la cromatografía gaseosa en que la fase móvil está representada por un gas inerte.

pH. Cuando el pH disminuye, los grupos con carga negativa se neutralizan y los grupos con carga positiva se vuelven más numerosos. Lo contrario ocurre cuando el pH aumenta. Existe un pH para cada proteína en el que el número total de cargas negativas es igual al de cargas positivas. Este pH es el **punto isoeléctrico**, en el que la proteína es neutra. El punto isoeléctrico de la mayoría de las proteínas está por debajo del pH 7.

La cromatografía de intercambio iónico depende del enlace iónico de las proteínas con una matriz de material inerte, como la celulosa, que contiene grupos cargados unidos mediante enlace covalente. Dos de las resinas de intercambio iónico más usuales son la dietilaminoetilcelulosa (DEAE) y la carboximetilcelulosa (CM). La DEAE-celulosa tiene cargas positivas, por lo que se une con moléculas de carga negativa; es un *intercambiador de aniones*. La CM-celulosa posee carga negativa y es un *intercambiador de cationes*. La resina se empaca en una columna y se permite que la solución de proteína pase por la columna en un amortiguador cuya composición promueve la unión de algunas o todas las proteínas con la resina. Las proteínas se unen con la resina en forma reversible y pueden desplazarse por el aumento en la fuerza iónica del amortiguador (que agrega iones para competir con los grupos cargados de las macromoléculas para sitios en la resina) o por el cambio de su pH. Las proteínas se extraen de la columna en orden, de la que tiene una unión menos fuerte a la unida con mayor fuerza. La figura 18-24 muestra una representación esquemática de la separación de dos especies de proteínas mediante la extracción por pasos de una columna de intercambio iónico.

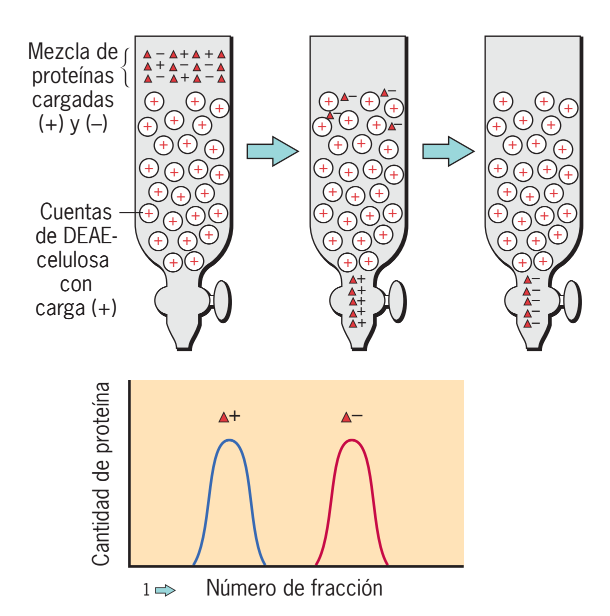


FIGURA 18-24 Cromatografía por intercambio iónico. Separación de dos proteínas mediante DEAE-celulosa. En este caso, una resina de intercambio con carga positiva se usa para unirse con la proteína con mayor carga negativa.

Cromatografía por filtración en gel

La **filtración en gel** separa proteínas (o ácidos nucleicos) con base en su tamaño efectivo (*radio hidrodinámico*). Como la cromatografía de intercambio iónico, el material de separación consiste en cuentas diminutas que se empacan en una columna a través de la cual la solución de proteína pasa lentamente. Los materiales que se emplean en la filtración por gel se componen de polisacáridos con enlaces cruzados (dextranos o agarosa) de distinta porosidad, lo que permite que las proteínas se difundan dentro y fuera de las cuentas. La mejor forma de describir la técnica es con un ejemplo (fig. 18-25).

Supóngase que se intenta purificar una proteína globular con una masa molecular de 125 000 daltones. Esta proteína se encuentra en solución con dos proteínas contaminantes de forma similar, una mucho más grande de 250 000 daltones, y la otra mucho más pequeña, de 75 000 daltones. Un modo en que la proteína podría purificarse consiste en pasar la mezcla por una columna de cuentas Sephadex G-150, que permite la entrada de proteínas globulares menores de 200 kDa. Cuando la mezcla de proteínas pasa por el lecho de la columna, la proteína de 250 kDa es incapaz de entrar a las cuentas y permanece disuelta en la fase solvente móvil. Como resultado la proteína de 250 kDa se extrae en cuanto el solvente de la columna (el volumen del lecho) termina de gotear. En cambio, las otras dos proteínas pueden difundirse a los intersticios entre las cuentas y su paso por la columna se retrasa. Conforme más solvente pasa por la columna, estas proteínas se mueven hacia abajo y salen por el fondo, pero lo hacen a distintas velocidades. Entre las proteínas que entran a las cuentas, las especies más pequeñas se retrasan más que las grandes. Por consiguiente, la proteína de 125 kDa se extrae en estado purificado, en tanto que la proteína de 75 kDa permanece en la columna.

Cromatografía por afinidad

Las técnicas descritas hasta ahora utilizan las propiedades gruesas de una proteína para realizar la purificación o el fraccionamiento. Otra técnica de purificación llamada **cromatografía por afinidad** aprovecha las

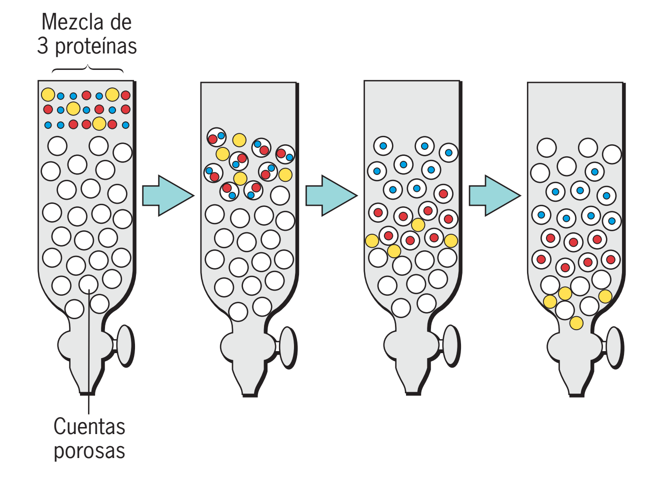


FIGURA 18-25 Cromatografía por filtración en gel. Separación de tres proteínas globulares con diferente masa molecular, como se describe en el texto. Entre las proteínas con forma básica similar, las moléculas más grandes se eliminan antes que las pequeñas.

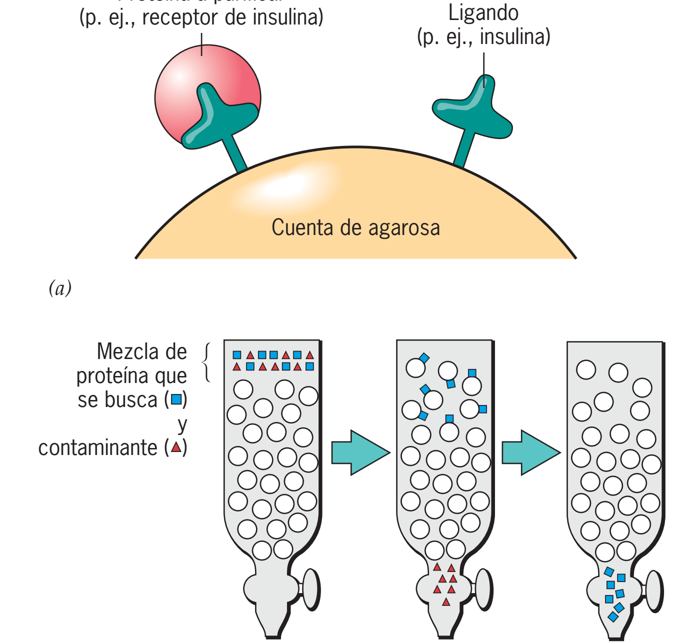


FIGURA 18-26 **Cromatografía por afinidad.** *a*) Representación esquemática de las cuentas cubiertas con agarosa con las que sólo puede combinarse una proteína específica. *b*) Pasos del procedimiento cromatográfico.

propiedades estructurales únicas de una proteína, lo que permite que una especie de proteína se retire de manera específica de la solución mientras que las demás quedan en ésta (fig. 18-26). Las proteínas interactúan con sustancias específicas: enzimas con sustratos, receptores con ligandos, antígenos con anticuerpos, etc. Cada uno de estos tipos de proteínas puede retirarse de la solución si la mezcla de proteínas se pasa a través de una columna en la que la molécula específica de interacción (sustrato, ligando, anticuerpo, etc.) se une mediante enlaces covalentes con un material inerte e inmovilizado (la matriz). Si, por ejemplo, una preparación impura de un receptor para acetilcolina se pasa por una columna que contiene cuentas de agarosa a la que se une un análogo de acetilcolina, el receptor se une de modo específico con las cuentas siempre que las condiciones en la columna sean adecuadas para promover la interacción (pág. 172). Una vez que todas las proteínas contaminantes pasaron por la columna y salieron por el fondo, las moléculas del receptor para acetilcolina pueden desplazarse de sus sitios de unión en la matriz mediante el cambio de la composición iónica o el pH del solvente en la columna. Por tanto, a diferencia de otros procedimientos cromatográficos que separan proteínas con base en su tamaño o carga, la cromatografía por afinidad puede lograr una purificación casi total de la molécula deseada en un solo paso.

Determinación de las interacciones proteína-proteína Una de las maneras de aprender respecto a la función de una proteína consiste en identificar las proteínas con las que interactúa. Se cuenta con varias técnicas disponibles para identificar qué proteínas de una célula podrían interactuar con una proteína determinada que ya se identificó. Una de estas técnicas acaba de describirse: la cromatografía por afinidad. Otra técnica utiliza anticuerpos. Por ejemplo, considérese que la proteína A, que ya se identificó y purificó, es parte de un complejo con otras dos proteínas en el citoplasma, las proteínas B y C. Una vez que la proteína A se purifica, puede obtenerse un anticuerpo contra esta proteína y usarse como sonda para unirse y retirar la proteína A de la solución. Si se prepara un extracto celular que contenga el complejo proteico A-B-C y el extracto se incuba con el anticuerpo contra A, la unión del anticuerpo con la proteína A suele producir la *coprecipitación* de otras proteínas unidas con A, en este caso las proteínas B y C, que pueden identificarse enseguida. La coprecipitación de los fragmentos de DNA se describió en la página 523.

La técnica de uso más frecuente para buscar interacciones proteína-proteína es el **sistema de dos híbridos de levadura** que Stanley Fields y Ok-kyu Song de la *New York State University* en Stony Brook inventaron en 1989. Esta técnica se ilustra en la figura 18-27 y depende de la expresión de un gen reportero, como la galactosidasa beta (*lacZ*), cuya actividad es fácil de vigilar mediante una prueba que detecta un cambio de color en presencia de la enzima en una población de células de levadura. La expresión del gen *lacZ* en este sistema se activa por una proteína particular (un factor de transcripción) que contiene dos dominios, un dominio para unión con DNA y un dominio de activación (fig. 18-27*a*). El dominio de unión con DNA media la unión con el promotor y el dominio de activación media la interacción con otras proteínas participantes en la activación de la expresión del gen. Ambos dominios deben estar presentes para que haya transcripción. Para emplear esta técnica se preparan dos tipos diferentes de moléculas de DNA recombinante. Una molécula de DNA contiene un segmento de DNA que codifica el dominio de unión con DNA del factor de transcripción unido con un segmento de DNA que codifica la proteína "carnada" (X). La proteína carnada es la que se caracterizó y aquella para la que se buscan compuestos potenciales de unión. Cuando este DNA recombinante se expresa en una célula de levadura, la célula produce una proteína híbrida como la que se muestra en la figura 18-27*b*. La otra molécula de DNA contiene una porción del factor de transcripción que codifica el dominio de activación unido con el DNA que codifica una proteína desconocida (Y). Estos DNA (o cDNA como se les conoce) se preparan de los mRNA por acción de la transcriptasa inversa como se describe en la página 768. Asúmase que Y es una proteína capaz de unirse con la proteína carnada. Cuando un DNA recombinante que codifica Y se expresa en una célula de levadura, la célula produce una proteína híbrida como la mostrada en la figura 18-27*c*. Cuando se produce en una sola célula, ni la proteína híbrida que contiene X ni la que contiene Y son capaces de activar la transcripción del gen *lacZ* (fig. 18-27*b*, *c*). Sin embargo, si estas dos moléculas de DNA recombinante particulares se introducen en la misma célula de levadura (como en la figura 18-27*d*), las proteínas X y Y pueden interactuar una con la otra para reconstituir un factor de transcripción funcional, un fenómeno que puede detectarse por la capacidad de la célula para producir galactosidasa beta. Con esta técnica los investigadores pueden "pescar" proteínas codificadas por genes desconocidos capaces de interactuar con la pro-

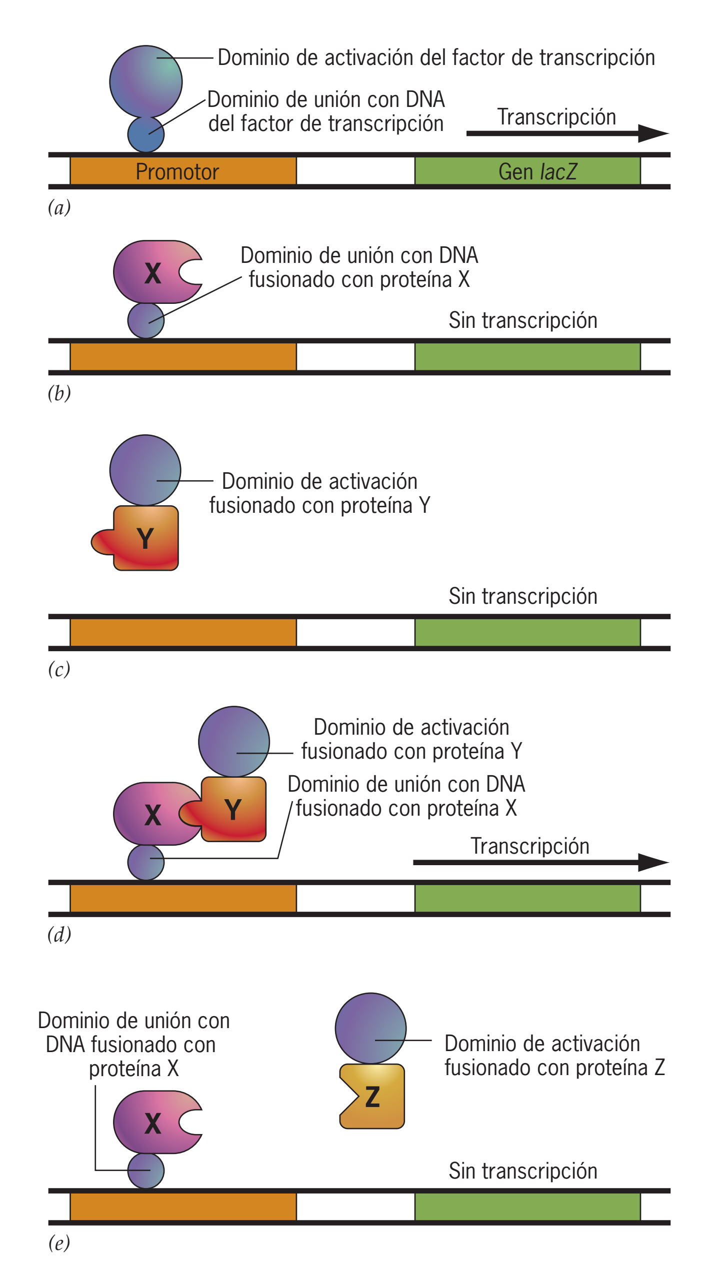


FIGURA 18-27 **Uso del sistema de dos híbridos de levaduras.** Esta prueba para la interacción entre dos proteínas depende de que una célula sea capaz de reunir dos partes de un factor de transcripción. *a*) Las dos partes del factor de transcripción (el dominio para unión con DNA y el dominio de activación) se ven aquí conforme el factor de transcripción se une con el promotor de un gen (*lacZ*) que codifica la galactosidasa beta. *b*) En este caso, una célula de levadura sintetizó el dominio para unión con DNA del factor de transcripción unido con una proteína X "carnada". Este complejo no puede activar la transcripción. *c*) En este caso, una célula de levadura sintetizó el dominio de activación del factor de transcripción unido con una proteína Y desconocida ("pescado"). Este complejo no puede activar la transcripción. *d*) Una célula de levadura sintetizó las proteínas X y Y, lo que reconstituye un factor de transcripción completo y permite la expresión de *lacZ*, que es fácil de detectar. *e*) Si el segundo DNA codificó una proteína, por ejemplo, Z, que no pudo unirse con X, la expresión del gen reportero no se habría detectado.

teína "carnada". El uso de esta técnica en estudios de proteómica se describe en la página 62.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Otra técnica poderosa que se utiliza mucho para fraccionar proteínas es la **electroforesis**. La electroforesis depende de la capacidad de moléculas cargadas para migrar cuando se colocan en un campo eléctrico. La separación electroforética de proteínas casi siempre se realiza por **electroforesis en gel de poliacrilamida** (**PAGE**), en la que las proteínas son impulsadas por una corriente que se aplica a través de una matriz gelatinosa. La matriz se compone de polímeros de una pequeña molécula orgánica (acrilamida) que establece enlaces cruzados para formar un tamiz molecular. Puede formarse un gel de poliacrilamida como una losa delgada entre dos placas de vidrio o como un cilindro dentro de un tubo de vidrio. Una vez que el gel se polimeriza, la losa (o tubo) se suspende entre dos compartimientos que contienen un amortiguador en el que se sumergen electrodos opuestos. En un gel en forma de losa, la muestra concentrada que contiene las proteínas se coloca en ranuras sobre el borde superior del gel, como se muestra en el paso 1 de la figura 18-28. La muestra de proteína se prepara en una solución que contiene sacarosa o glicerol, cuya densidad impide que la mezcla se combine con el amortiguador en el compartimiento superior. Luego se aplica voltaje entre los compartimientos del amortiguador y la corriente fluye por la losa, lo que hace que las proteínas se muevan hacia el electrodo con carga opuesta (paso 2). Por lo general la separación se efectúa con amortiguadores alcalinos, lo que ocasiona que las proteínas tengan una carga negativa y las obliga a migrar hacia el ánodo de carga positiva en el extremo contrario del gel. Después de la electroforesis, la losa se retira de las placas de vidrio y se tiñe (paso 3).

El movimiento relativo de las proteínas por un gel de poliacrilamida depende de la *densidad de carga* (carga por unidad de masa) de las moléculas. Mientras mayor sea la densidad de carga, la proteína se impulsa con más fuerza por el gel y por tanto la migración es más rápida. No obstante, la densidad de carga es sólo un factor importante en el fraccionamiento por PAGE; el tamaño y la forma también influyen. La poliacrilamida forma un tamiz molecular con enlaces cruzados que enreda las proteínas que pasan por el gel. Entre mayor sea la proteína, más se enreda y migra con más lentitud. La forma también es un factor importante, porque las proteínas globulares compactas se mueven más rápido que las proteínas fibrosas alargadas de masa molecular similar. La concentración de acrilamida (y el agente de los enlaces cruzados) que se emplea para hacer el gel es otro factor importante. A menor concentración de acrilamida, menos enlaces cruzados se forman en el gel y la migración de una molécula proteica determinada puede ser más rápida. Un gel que contiene 5% de acrilamida podría ser útil para separar proteínas de 60 a 250 kDa, en tanto que el gel con 15% de acrilamida permitiría separar proteínas de 10 a 50 kDa.

El progreso de la electroforesis se sigue al observar la migración de un *tinte rastreador* cargado que se mueve justo por delante de las proteínas más rápidas (paso 2, fig. 18-28). Después que el tinte rastreador se movió a la localización deseada, la corriente se corta y el gel se retira de su recipiente. Por lo general el gel se tiñe con azul Coomassie o tinción de plata para revelar

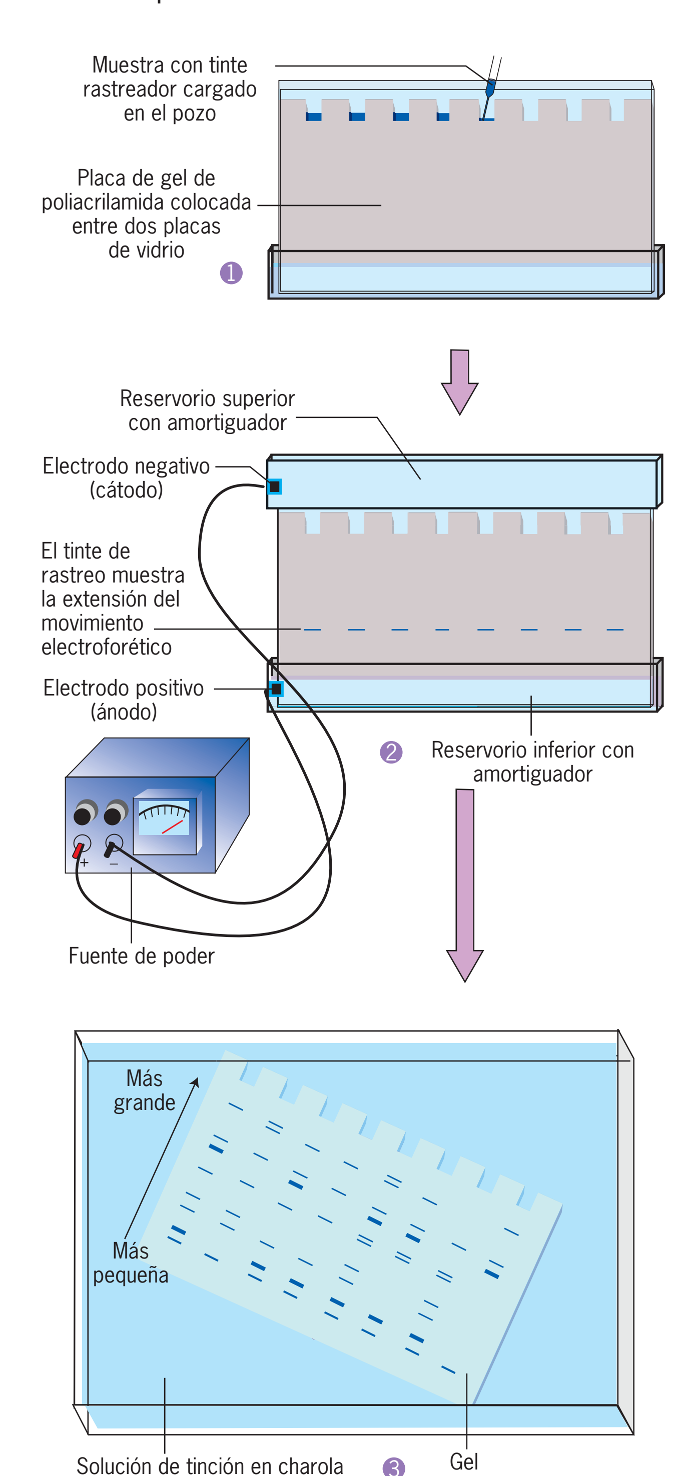


FIGURA 18-28 Electroforesis en gel de poliacrilamida. Las muestras de proteína suelen disolverse en una solución de sacarosa cuya densidad impide que la muestra se mezcle con el amortiguador y luego se carga en los pozos con una pipeta fina como se muestra en el paso 1. En el paso 2 se aplica una corriente directa al gel, lo que ocasiona que las proteínas se muevan en la poliacrilamida en carriles paralelos. Cuando se realiza en el detergente SDS, como casi siempre sucede, las proteínas se mueven como bandas a velocidades inversamente proporcionales a su masa molecular. Una vez que la electroforesis se completa, el gel se retira del marco de vidrio y se tiñe en una charola (paso 3).

la localización de las proteínas. Si las proteínas tienen marca radiactiva, su localización puede reconocerse al presionar el gel contra un fragmento de película para rayos X a fin de producir una autorradiografía o el gel puede rebanarse en fracciones y las proteínas individuales aislarse. Una alternativa consiste en transferir las proteínas del gel por un segundo procedimiento electroforético a una membrana de nitrocelulosa para formar una mancha (pág. 757). Las proteínas se absorben en la superficie de la membrana en las mismas posiciones relativas que ocupan en el gel. En una inmunotransferencia (*Western blot*), las proteínas en la membrana se identifican por su interacción con anticuerpos específicos.

SDS-PAGE La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) suele llevarse a cabo en presencia del detergente con carga negativa sulfato de dodecilo sódico (SDS), que se une en grandes cantidades con todos los tipos de moléculas de proteína (pág. 132). La repulsión electrostática entre las moléculas unidas del SDS hace que las proteínas se desplieguen en forma similar a un bastón, lo que elimina las diferencias en la forma como factor para la separación. El número de moléculas de SDS que se unen con una proteína es casi proporcional a la masa molecular de la proteína (cerca de 1.4 g de SDS por gramo de proteína). Por consiguiente cada especie de proteína, sin importar el tamaño, tiene una densidad de carga equivalente y se impulsa por el gel con la misma fuerza. Sin embargo, como la poliacrilamida tiene muchos enlaces cruzados, las proteínas más grandes se retienen en mayor medida que las pequeñas. Como resultado las proteínas se separan por SDS-PAGE con base en una sola propiedad: su masa molecular. Además de separar las proteínas de una mezcla, la técnica SDS-PAGE puede usarse para determinar la masa molecular de varias proteínas mediante la comparación de las posiciones en las bandas con las producidas por proteínas de tamaño conocido. En las páginas 145 y 173 se muestran ejemplos de SDS-PAGE.

Electroforesis en gel bidimensional En 1975, Patrick O'Farrell de la *California University* en San Francisco, desarrolló una técnica llamada *electroforesis bidimensional en gel* para fraccionar mezclas complejas de proteínas con el uso de dos propiedades diferentes de las moléculas. Las proteínas se separan primero en un gel tubular de acuerdo con su punto isoeléctrico por una técnica denominada *enfoque isoeléctrico*. Tras la separación, el gel se retira y se coloca arriba de una losa de poliacrilamida saturada con SDS para someterla a SDS-PAGE. Las proteínas se mueven hacia el gel de la losa y se separan de acuerdo con su masa molecular (fig. 18-29). Una vez separadas, las proteínas individuales pueden retirarse del gel y digerirse en fragmentos peptídicos susceptibles de analizarse mediante espectrometría de masa. La resolución de esta técnica es suficiente para distinguir la mayoría de las proteínas de una célula. Por su gran poder de resolución, la electroforesis bidimensional en gel es ideal para detectar cambios en las proteínas presentes en una célula en distintas condiciones, en diferentes etapas de desarrollo o del ciclo celular o en distintos organismos (véase fig. 2-47). Sin embargo, la técnica no es adecuada para diferenciar entre proteínas que tienen una masa molecular elevada, que son muy hidrófobas o de las que hay muy pocas copias en la célula.

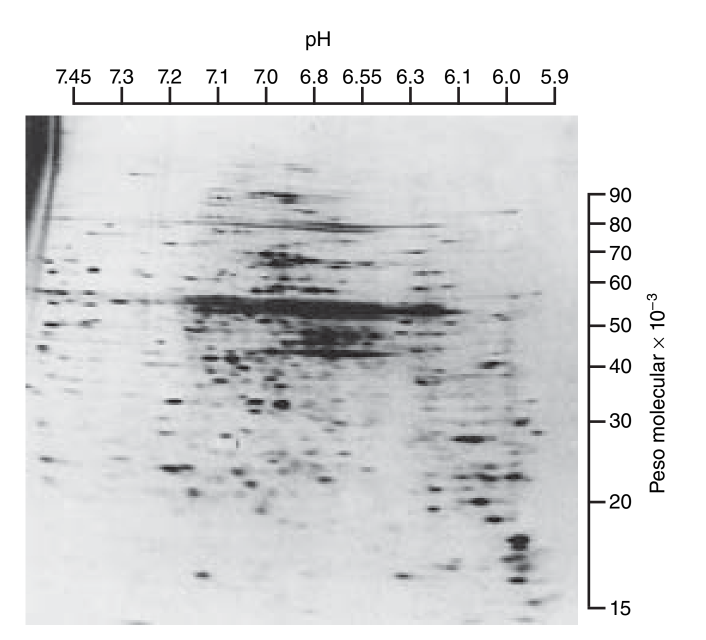


FIGURA 18-29 Electroforesis bidimensional en gel. Gel de poliacrilamida bidimensional de proteínas cromosómicas no histonas de la célula HeLa marcadas con [^{35}S]metionina. Con esta técnica pueden resolverse más de mil proteínas diferentes. (TOMADA DE J. L. PETERSON Y E. H. MCCONKEY, J BIOL CHEM 251:550, 1976.)

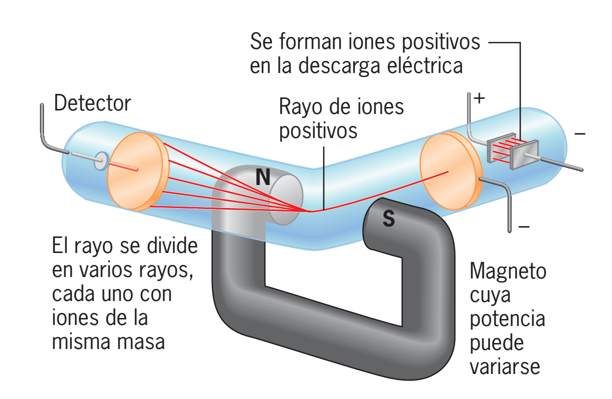


FIGURA 18-30 Principios de operación de un espectrómetro de masa. (TOMADA DE J. E. BRADY, J. RUSSELL Y J. R. HOLUM, CHEMISTRY 3RD ED. DERECHOS RESERVADOS © 2000, JOHN WILEY AND SONS, INC. REIMPRESA CON AUTORIZACIÓN DE JOHN WILEY AND SONS, INC.)

Medición y análisis de proteínas

Uno de los métodos más sencillos y usuales para identificar la cantidad de proteína o ácido nucleico presente en una solución determinada es medir la cantidad de luz de una longitud de onda específica que absorbe esa solución. El instrumento empleado para efectuar esta medición es el **espectrofotómetro**. Para realizar este tipo de medición la solución se deposita en un recipiente especial de cuarzo con lados planos (se usa cuarzo porque, a diferencia del vidrio, no absorbe la luz ultravioleta) llamado *cubeta*, que se coloca en el haz de luz del espectrofotómetro. La cantidad de luz que pasa por la solución sin ser absorbida (es decir, la luz transmitida) se mide en fotoceldas del otro lado de la cubeta.

Dos de los 20 aminoácidos incorporados en las proteínas, la tirosina y la fenilalanina, absorben la luz del espectro ultravioleta, con una absorbancia máxima cercana a 280 nm. Si las proteínas en estudio tienen un porcentaje típico de estos aminoácidos, la absorbancia de la solución en esta longitud de onda proporciona una medida de la concentración de proteína. Una alternativa es emplear varias pruebas químicas, como la técnica de Lowry o de Biuret, en las que la proteína en solución participa en una reacción que produce un compuesto coloreado cuya concentración es proporcional a la concentración de proteína.

Espectrometría de masa Como se explica en la página 69, el campo emergente de la proteómica depende mucho del análisis de las proteínas mediante *espectrometría de masa*. Los espectrómetros de masa son instrumentos analíticos que se usan sobre todo para medir las masas de moléculas, determinar fórmulas químicas y estructura molecular, y para identificar sustancias desconocidas. Los espectrómetros de masa realizan estas tareas mediante la conversión de sustancias de una muestra en iones gaseosos con cargas positivas, que se aceleran a través de un tubo curvo hacia una placa con carga negativa (fig. 18-30). Cuando los iones pasan por el tubo, se someten a un campo magnético que los separa unos de otros de acuerdo con su masa molecular [o, de manera más precisa, según su proporción entre masa y carga (m/z)]. Los iones golpean un detector electrónico que se localiza al final del tubo. Los iones más pequeños viajan más rápido y golpean el detector con más rapidez que los iones más grandes. La información del detector se convierte en una serie de picos del índice *m/z* ascendente (como en la figura 2-48).

Aunque los espectrómetros de masa han sido los instrumentos favoritos de los químicos durante muchos años, hace apenas unos 10 años que los biólogos descubrieron sus sorprendentes poderes analíticos. Ahora, con la espectrometría de masa (MS), los bioquímicos pueden identificar proteínas desconocidas en cuestión de horas. Para realizar este análisis las proteínas suelen digerirse con tripsina y los péptidos resultantes se ionizan con suavidad y se convierten en gases por uno de dos procedimientos. El desarrollo de estas técnicas de ionización de péptidos fue clave para adaptar la MS al estudio de las proteínas. En un procedimiento, llamado *ionización por desorción con láser asistida por matriz* (*MALDI*), la muestra de proteína se aplica como parte de una matriz cristalina que se irradia con un pulso de láser. La energía del láser excita la matriz y la energía absorbida convierte los péptidos en iones gaseosos. En un procedimiento alternativo, la *ionización de electroaerosol* (*ESI*), se aplica un potencial eléctrico a una solución peptídica, lo que hace que los péptidos se ionicen y el líquido se rocíe como un fino aerosol de partículas cargadas que entran al espectrómetro. Como actúa sobre las moléculas en solución, la ESI es adecuada para ionizar péptidos preparados con proteínas fraccionadas mediante una técnica de cromatografía líquida que se usa con mucha frecuencia.

Una vez que las masas moleculares de los péptidos en la muestra se conocen, la proteína completa puede identificarse mediante la búsqueda en una base de datos como se describe en la página 71. Si la proteína no se identifica sin ambigüedades,

uno o más de los péptidos generados mediante digestión con tripsina[5] pueden fragmentarse en un segundo paso para someterlos a otra ronda de espectrometría de masa. Este procedimiento de dos pasos (llamado MS en tándem o MS/MS) permite conocer la secuencia de aminoácidos de los péptidos e identificar de manera inequívoca a la proteína. La MS/MS es tan potente que las mezclas complejas de cientos de proteínas desconocidas pueden digerirse y someterse a espectrometría de masa para identificar de una sola vez cada una de las proteínas de la mezcla.

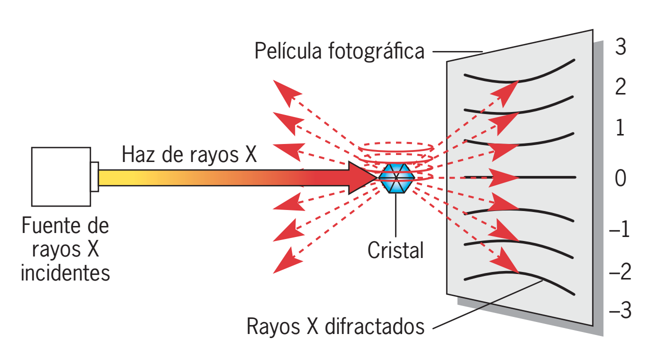


FIGURA 18-31 Análisis por difracción de rayos X. Diagrama de la difracción de rayos X por átomos de un plano de un cristal en una placa fotográfica. La serie ordenada de los rayos dentro del cristal produce una serie repetitiva de ondas circulares superpuestas que se dispersan e intersectan la película. Como sucede con la difracción de la luz visible, las ondas forman un patrón de interferencia que se refuerzan unas a otras en algunos puntos de la película y se cancelan entre sí en otros puntos.

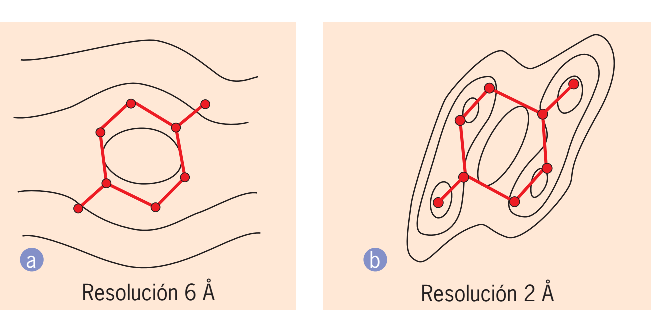
18.8 IDENTIFICACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE PROTEÍNAS Y COMPLEJOS MULTISUBUNITARIOS

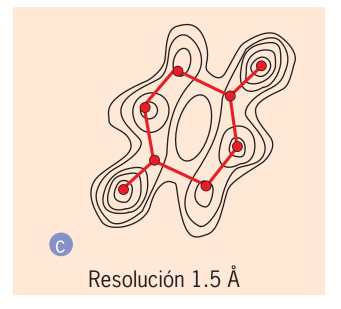
La **cristalografía por rayos X** (o **difracción de rayos X**) utiliza cristales de proteína que se bombardean con un fino haz de rayos X (fig. 18-31). La radiación que se dispersa (difracta) por los electrones de los átomos de la proteína golpea un detector sensible a los electrones situado detrás del cristal. El patrón de diferenciación que el cristal produce depende de la estructura interna de la proteína; la gran cantidad de moléculas en el cristal refuerza las reflexiones y ocasiona que se comporte como si fuera una molécula gigante. Las posiciones e intensidades de los reflejos, como los de la placa fotográfica de la figura 2-33, pueden relacionarse en forma matemática con las densidades electrónicas dentro de la proteína porque son los electrones de los átomos los que produjeron esas reflexiones. La resolución obtenida por la difracción de los rayos X depende de la cantidad de manchas que se analice.

La mioglobina fue la primera proteína cuya estructura se identificó por difracción de rayos X. La proteína se analizó de modo sucesivo con 6, 2 y 1.4 Å, con periodos de años entre cada identificación completa. Si se considera que los enlaces covalentes miden entre 1 y 1.5 Å de largo, y los enlaces no covalentes miden entre 2.8 y 4 Å de longitud, la información reunida para una proteína depende de la resolución lograda. Esto se ilustra con una comparación de la densidad electrónica de una pequeña molécula orgánica en cuatro niveles de resolución (fig. 18-32). En la mioglobina, una resolución de 6 Å fue suficiente para mostrar la manera en que la cadena polipeptídica se pliega y la localización de la fracción hemo, pero no para mostrar la estructura dentro de la cadena. Una resolución de 2 Å permitió separar los grupos de átomos unos de otros, mientras que con 1.4 Å se reconocieron las posiciones de los átomos individuales. A la fecha se han determinado las estructuras de varios cientos de proteínas con resolución atómica (<1.2 Å) y unas cuantas con resolución de apenas 0.66 Å.

Con los años, la tecnología de difracción de rayos X mejoró mucho. Le tomó a Max Perutz 22 años resolver la estructura de la hemoglobina (fig. 2-38), una tarea que en la actualidad requeriría unas pocas semanas. En la mayoría de los estudios actuales: 1) se generan haces de rayos X intensos y muy enfocados con

[5] La fragmentación se logra dentro de un espectrómetro de masa mediante la colisión de los péptidos con un gas inerte. La energía del choque rompe los enlaces peptídicos para producir una colección aleatoria de fragmentos del péptido original. La secuencia de aminoácidos de cada fragmento, y por consecuencia del péptido original, puede determinarse si se busca en una base de datos que contenga las masas de los fragmentos teóricos con todas las secuencias posibles de aminoácidos que pueden formarse a partir de las proteínas codificadas por ese genoma.





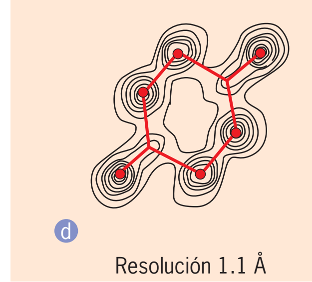


FIGURA 18-32 Distribución de densidad electrónica de una pequeña molécula orgánica (dicetopiperacina) calculada con varios niveles de resolución. Con la resolución más baja (a) sólo puede distinguirse la naturaleza anular, mientras que la resolución más alta (d) revela la densidad electrónica alrededor de cada átomo (indicada por las líneas de contorno circular). (Tomada de D. Hodgkin. Reimpresa con autorización de Nature 188:445, 1960. © 1960, Macmillan Magazines Ltd.)

sincrotrones (véase pág. 100), que son aceleradores de partículas de alta energía que producen rayos X como producto intermediario, y 2) las placas fotográficas se sustituyeron por detectores electrónicos muy sensibles (instrumentos unidos por carga o CCD) que proporcionan una lectura digital de los datos de la difracción. El uso de estos instrumentos junto con computadoras cada vez más potentes permite a los investigadores reunir y analizar datos suficientes para reconocer la estructura terciaria de casi todas las proteínas en cuestión de horas. Como resultado de estos avances la cristalografía con rayos X se aplica al análisis de estructuras moleculares cada vez más grandes. Es probable que la mejor forma de ilustrar esto sea con el éxito obtenido en la identificación de la estructura del ribosoma, que se explica en el capítulo 11. En la mayoría de los casos, como sucedió con el estudio del ribosoma, el principal desafío en este campo es obtener cristales útiles.

Aunque la cristalografía por rayos X es ideal para identificar la estructura de proteínas solubles que se prestan a la cristalización, puede ser muy desafiante en el estudio de estructuras complejas con múltiples subunidades, como los ribosomas o los proteasomas, o para proteínas de membrana, de las que es difícil obtener los cristales tridimensionales necesarios para el análisis. A menudo el análisis estructural de estos tipos de especímenes se realiza con una técnica alternativa que aprovecha la ventaja del inmenso poder de resolución del microscopio electrónico y las técnicas de procesamiento de imagen basadas en computadora. Existen dos métodos generales para el estudio de partículas individuales al microscopio electrónico. En uno de ellos, las partículas se colocan en una rejilla de microscopio electrónico y se les aplica tinción negativa (como se expone en la página 738). En el otro método, que se conoce como *criomicroscopia electrónica*, o *crio-EM*, las partículas se colocan en una rejilla y se congelan con rapidez en nitrógeno líquido sin fijarse ni teñirse. En ambos casos, las rejillas se colocan en la columna del microscopio y se toman fotografías de las partículas. Cada fotografía es una imagen bidimensional de una partícula individual en la orientación que asume cuando se valora en la rejilla. Cuando las imágenes bidimensionales de decenas de miles de especímenes diferentes en todas las orientaciones concebibles se someten al análisis de una computadora de gran potencia, puede reconstruirse una imagen tridimensional de la partícula con una resolución de tan sólo 5 Å. La figura 2-55 ilustra un modelo de un ribosoma eucariota obtenido con esta técnica. Esta técnica también es útil para capturar imágenes de una estructura, como un ribosoma, en diferentes etapas de un proceso dinámico, como el paso de elongación de la síntesis proteica. Con este método se han revelado varios de los principales cambios conformacionales que ocurren durante cada paso de la traducción.

Además, las estructuras de resolución atómica determinadas por cristalografía de rayos X pueden ajustarse en las reconstrucciones de microscopia electrónica de menor resolución para mostrar cómo interactúan las moléculas individuales que constituyen un complejo multisubunitario y cómo podrían trabajar juntas para realizar una actividad específica. En la figura 18-33 se muestra la estructura terciaria de un filamento compuesto de actina y ADF (un miembro de la familia de la cofilina, pág. 376). Las estructuras de las dos proteínas se determinaron mediante estudios de cristalografía de rayos X separados y luego se ajustaron en un modelo de microscopia electrónica de un filamento de actina-ADF. La reconstrucción mostrada en la figura sirvió como base para un mecanismo propuesto, mediante el cual las proteínas de la familia de la cofilina pueden inducir el corte y la despolimerización de un filamento de actina (pág. 380).

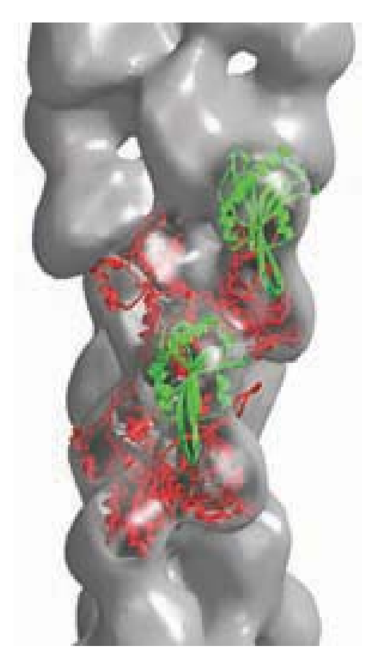


FIGURA 18-33 **La combinación de datos de microscopia electrónica y cristalografía de rayos X** proporciona información sobre interacciones entre proteínas y sobre la estructura de complejos multisubunitarios. La reconstrucción basada en micrografías electrónicas de un filamento de actina-ADF se muestra en gris. Las estructuras obtenidas por cristalografía de rayos X de alta resolución de monómeros individuales de actina (rojo) y moléculas de ADF (verde) se ajustaron en la estructura determinada por EM, con menor resolución. (Tomada de Vitold E. Galkin, et al., cortesía de Edward H. Egelman, J. Cell Biol. 163:1059, 2003; con autorización del titular del copyright, Rockefeller University Press.)

La microscopia crioelectrónica también es adecuada para el estudio de proteínas de membrana, como los receptores nicotínicos para acetilcolina (véase la sección Vías experimentales del capítulo 4), que pueden empacarse muy ajustados a temperaturas muy bajas (p. ej., −195°C) en conjuntos cristalinos bidimensionales dentro del plano de la membrana. Las estructuras que se ilustran en la página 174 se identificaron a partir de imágenes microscópicas electrónicas de alta resolución combinadas de muchas moléculas de proteína diferentes tomadas en varios ángulos. Esta técnica se conoce como *cristalografía electrónica.*

18.9 PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Los pasos necesarios para la purificación de ácidos nucleicos son muy distintos de los que se emplean en la purificación de proteínas, lo que refleja la diferencia básica en la estructura de estos dos tipos de macromoléculas. El primer paso en la purificación de DNA suele ser la homogeneización de células y el aislamiento de los núcleos de los que se extrae el DNA. Los núcleos luego se extraen con una solución salina

amortiguada que contiene un detergente, como el SDS, que sirve para destruir los núcleos y liberar el DNA. La viscosidad de la solución se eleva mucho cuando el DNA se libera. El detergente también inhibe cualquier actividad de nucleasa presente en la preparación.

El principal objetivo de los siguientes pasos de la purificación es separar el DNA de los materiales contaminantes, como el RNA y las proteínas. Por lo general la eliminación de proteínas se efectúa al agitar la mezcla con un volumen de fenol. El fenol (o fenol/cloroformo como alternativa) es un desnaturalizante activo de las proteínas que causa que las proteínas de la preparación pierdan su solubilidad y se precipiten en la solución. Como el fenol y las soluciones salinas amortiguadas son inmiscibles, la suspensión sólo se centrifuga para separar las fases, lo que deja el DNA (y el RNA) en solución con la fase acuosa superior y la proteína presente como precipitado en el límite entre las dos fases. La fase acuosa se retira del tubo y se somete a ciclos repetidos de agitación con fenol y centrifugación hasta que ya no se retire más proteína de la solución. Después los ácidos nucleicos se precipitan de la solución con la adición de etanol frío. Con frecuencia el etanol frío forma una capa arriba de la solución acuosa de DNA y el DNA se enrolla en un cilindro de vidrio conforme sale de la solución en la interfase entre el etanol y la solución salina. En cambio, el RNA sale de la solución como un precipitado floculento que se asienta en el fondo del recipiente. Después de este procedimiento de purificación inicial el DNA se disuelve de nuevo y se trata con ribonucleasa para retirar el RNA contaminante. A continuación la ribonucleasa se destruye con una proteasa, que se retira mediante desproteinización con fenol, y el DNA se precipita con etanol.

El RNA puede purificarse en forma similar con DNAasa en los pasos finales de la purificación en lugar de ribonucleasa. En 1987 se publicó un procedimiento alternativo para aislar RNA en un solo paso. En esta técnica, los tejidos se homogeneizan en una solución que contiene tiocianato de guanidina 4 M y el extracto de RNA se mezcla con fenol y se agita con cloroformo (o bromocloropropano). Después la suspensión se centrifuga, lo que deja el RNA en la fase acuosa superior y el DNA y la proteína en el cambio de una fase a otra.

En un método alternativo de purificación de DNA se usan membranas o matrices a las cuales el DNA se unirá en condiciones específicas. Para purificar DNA usando uno de estos materiales, las células se lisan en una solución que facilita la unión selectiva del DNA a la matriz. El lisado se aplica a la matriz y los contaminantes se eliminan del DNA mediante lavado. Por último, la matriz se enjuaga del DNA con un amortiguador eluente. A menudo estas matrices se apilan en diminutas columnas dentro de tubos de centrífuga, para que los pasos de unión, lavado y elución puedan realizarse de modo eficiente mediante la aplicación de una fuerza centrífuga.

18.10 FRACCIONAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Cualquier método de fraccionamiento sistemático debe explotar las diferencias entre los miembros de una mezcla con fines de separación. Las moléculas de ácido nucleico pueden diferir entre sí en tamaño global, composición de bases, topología y secuencia de nucleótidos. Por tanto, los métodos de fraccionamiento para ácidos nucleicos se basan en estas características.

Separación de DNA por electroforesis en gel

De las diversas técnicas empleadas en el fraccionamiento de proteínas descritas antes, una de ellas, la electroforesis en gel, también se usa mucho para separar ácidos nucleicos con masa molecular diferente (o sea, longitud del nucleótido). Las moléculas pequeñas de RNA o DNA de unos cuantos cientos de nucleótidos o menos casi siempre se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida. Las moléculas más grandes tienen problemas para pasar por la poliacrilamida de enlaces cruzados y por lo general se fraccionan en gel de agarosa, que es más poroso. La agarosa es un polisacárido extraído de un alga marina; se disuelve con un amortiguador caliente, se vierte en un molde y se gelatiniza con el simple descenso de temperatura. La separación de moléculas de DNA mayores de 25 kb suele hacerse mediante la técnica de electroforesis en campo con pulsos en la que la dirección del campo eléctrico en el gel se cambia en forma periódica, lo que ocasiona que las moléculas de DNA se reorienten durante la migración.

Después de la electroforesis, los fragmentos de DNA en el gel se visualizan empapando el gel en una solución de colorante como bromuro de etidio. Éste se intercala en la doble hélice y hace que las bandas de DNA presenten fluorescencia cuando se ven con radiación ultravioleta (fig. 18-34). La sensibilidad de la electroforesis en gel es tan alta que moléculas de DNA o RNA que difieren por un solo nucleótido pueden separarse con esta técnica, una característica que dio origen a un método invaluable para la secuenciación del DNA (pág. 766). Dado que la rapidez de migración por un gel también puede ser afectada por la forma de la molécula, es posible usar la electroforesis para separar moléculas con diferente conformación, como formas circular y lineal o relajada y superenrollada (véase fig. 10-12).

Separación de ácidos nucleicos por ultracentrifugación

La experiencia indica que la estabilidad de una solución (o suspensión) depende de los componentes. La crema flota sobre la leche cruda, un precipitado fino se asienta en forma gradual en el fondo del recipiente y una solución de cloruro de sodio permanece estable por tiempo indefinido. Muchos factores determinan si un componente se asienta o no en un medio líquido; estos factores incluyen el tamaño, la forma y la densidad de la sustancia, así como la densidad y la viscosidad del medio. Si un componente de una solución o suspensión es más denso que el medio, la fuerza centrífuga determina que se concentre en el fondo de un tubo de la centrífuga. Las partículas más grandes se sedimentan con más rapidez que las pequeñas de forma y densidad similares. La tendencia de las moléculas a concentrarse durante la centrifugación se contrarresta por los efectos de la difusión, que ocasiona que las moléculas se redistribuyan de modo más uniforme (aleatorio). El desarrollo de las ultracentrífugas permitió generar fuerzas centrífugas de hasta 500 000 veces la fuerza de la gravedad, que son lo bastante grandes para contrarrestar los efectos de la difusión y hacen que las macromoléculas se sedimenten hacia el fondo de un tubo de centrífuga. La centrifugación se

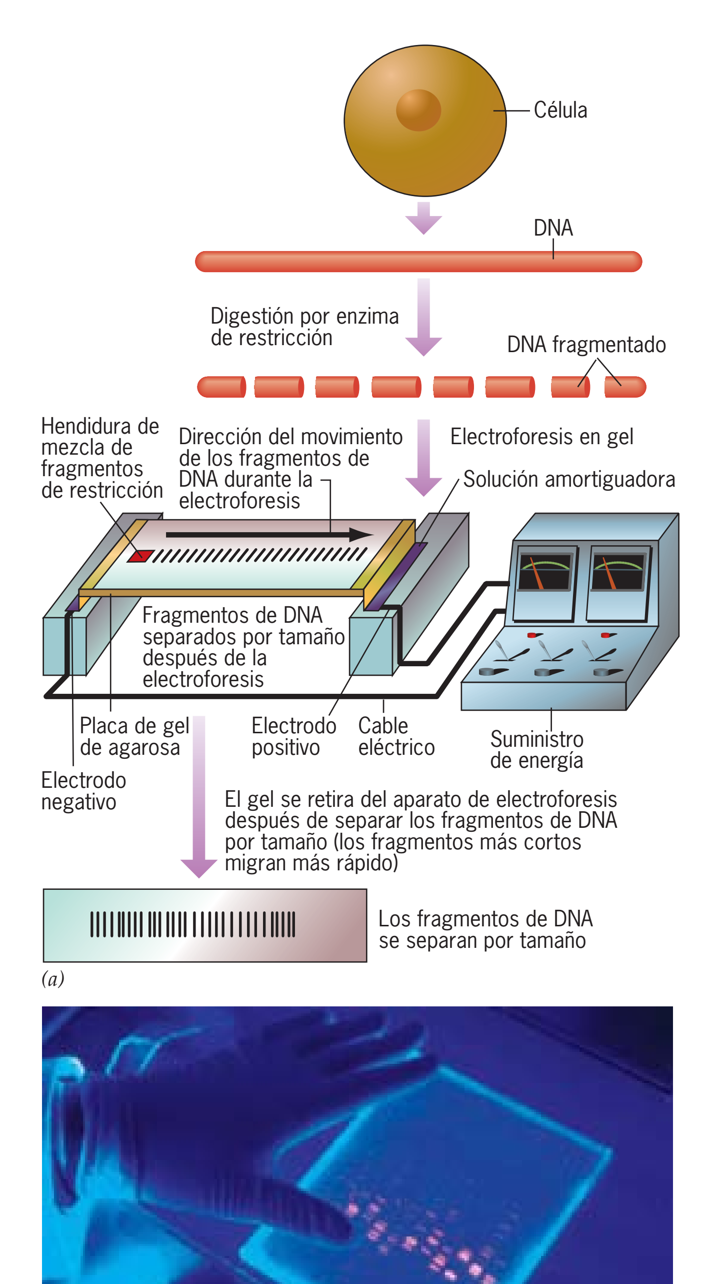


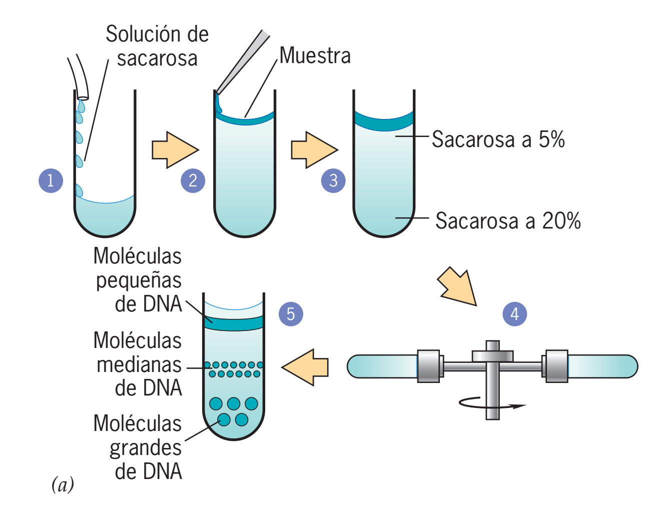
FIGURA 18-34 Separación de fragmentos de restricción de DNA por electroforesis en gel. *a*) El DNA se incuba con una enzima de restricción, que lo corta en fragmentos (pág. 759). La mezcla de fragmentos se introduce en una ranura o foso en una placa de agarosa y se aplica corriente eléctrica. Las moléculas de DNA con carga negativa emigran hacia el electrodo positivo y se separan por tamaño. *b*) Todos los fragmentos de DNA que están presentes en un gel pueden revelarse mediante la inmersión del gel en una solución de bromuro de etidio para luego observar el gel con luz ultravioleta. (*B*, FOTOGRAFÍA DE PHILLIPE PLAILLY/SCIENCE PHOTO LIBRARY/PHOTO RESEARCHERS.)

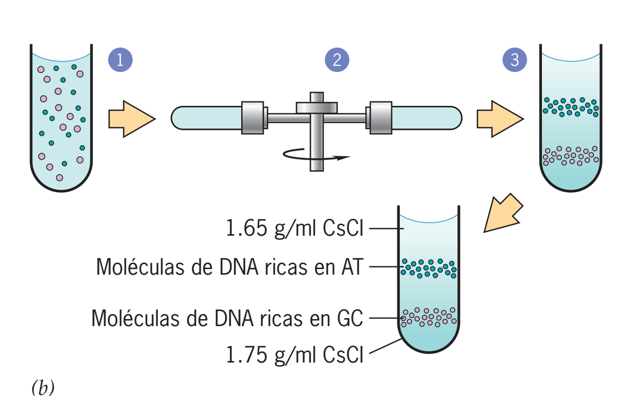
realiza en un ambiente casi de vacío para minimizar la resistencia por fricción. Las moléculas de DNA (y de RNA) se someten a análisis extensivos con técnicas que utilizan la ultracentrífuga. Para los fines de este capítulo se consideran dos de las técnicas de centrifugación más usuales en el estudio de los ácidos nucleicos que se ilustran en la figura 18-35.

Sedimentación por velocidad La rapidez con que una molécula dada se mueve en respuesta a la fuerza centrífuga es su *velocidad de sedimentación*. Dado que la velocidad de sedimentación cambia con la fuerza centrífuga, una molécula dada se caracteriza por un coeficiente de sedimentación, que es la velocidad de sedimentación dividida entre la fuerza. En todo este libro se ha aludido al valor S de diversas macromoléculas y sus complejos. La unidad S (o Svedberg, en honor del inventor de la ultracentrífuga) equivale a un coeficiente de sedimentación de 10^{-13} s. Dado que la velocidad con que una partícula se mueve por una columna de líquido depende de varios factores, incluida la forma, la determinación de los coeficientes de sedimentación no proporciona por sí sola la masa molecular. Sin embargo, mientras se trate del mismo tipo de molécula, el valor S proporciona una buena medida del tamaño relativo. Por ejemplo, los tres RNA ribosómicos de *E. coli*, a saber, las moléculas de 5S, 16S y 23S, tienen longitudes de 120, 1 600 y 3 200 nucleótidos, respectivamente.

En la *sedimentación por velocidad* (o *por zona de velocidad*), las moléculas de ácido nucleico se separan según la longitud del nucleótido. La muestra que contiene la mezcla de moléculas de ácido nucleico se divide con cuidado en capas sobre una solución que contiene una concentración creciente de sacarosa (u otra sustancia adecuada). Este gradiente preformado aumenta la densidad (y la viscosidad) desde la superficie al fondo. Cuando se someten a grandes fuerzas centrífugas, las moléculas se mueven por el gradiente a una velocidad determinada por su coeficiente de sedimentación. A mayor coeficiente de sedimentación, más lejos se mueve la molécula en un periodo determinado de centrifugación. Como la densidad del medio es menor que la de las moléculas de ácido nucleico, aun en el fondo del tubo (alrededor de 1.2 g/ml para la solución de sacarosa y 1.7 g/ml para el ácido nucleico), estas moléculas continúan su sedimentación siempre que el tubo se centrifugue. En otras palabras, la centrifugación nunca alcanza el equilibrio. Después de un periodo prescrito, el tubo se retira de la centrífuga, su contenido se fracciona (como se muestra en la figura 18-35*c*) y se determinan las posiciones relativas de las diversas moléculas. La presencia de la sacarosa viscosa impide que el tubo se mezcle a causa de la convección o la manipulación, lo que permite que las moléculas con valor S idéntico permanezcan en su sitio en la forma de una banda. El valor S de los componentes desconocidos puede establecerse si están presentes moléculas marcadoras con un coeficiente de sedimentación conocido. Las figuras 11-13 y 11-17 muestran los resultados experimentales obtenidos mediante la centrifugación con gradiente de densidad de sacarosa.

Centrifugación de equilibrio En el otro tipo de técnica de centrifugación, la *centrifugación de equilibrio* (o *isopícnica*) (fig. 18-35*b*), las moléculas de ácido nucleico se separan según su densidad de flotación. Por lo general en este procedimiento se utiliza una solución muy concentrada de la sal del metal pesado cesio. El análisis se inicia con la mezcla del DNA con la solución de cloruro de cesio o sulfato de cesio en el tubo de la centrífuga para luego someter el tubo a centrifugación prolongada (p. ej.,





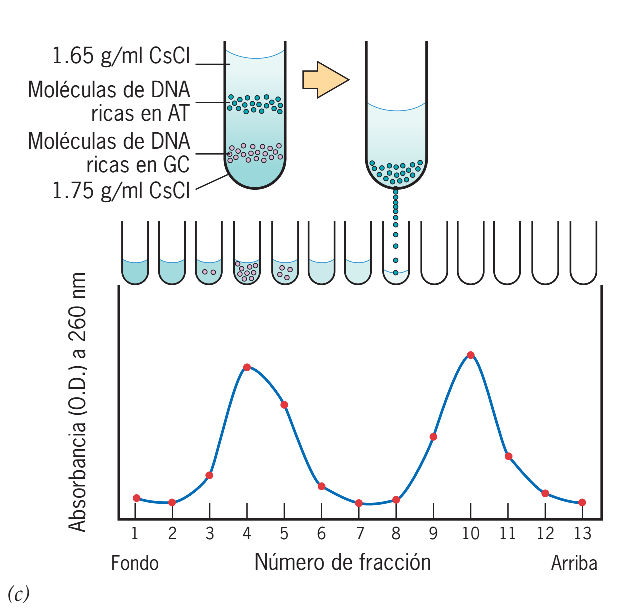


FIGURA 18-35 Técnicas de sedimentación de ácido nucleico. *a*) Separación de moléculas de DNA de diferente tamaño por la velocidad de sedimentación. El gradiente de densidad de la sacarosa se establece dentro del tubo (paso 1) al permitir que una solución de sacarosa de concentración cada vez mayor drene por la pared del tubo. Una vez que el gradiente se forma, la muestra se divide en capas con cuidado en la parte alta del gradiente (pasos 2 y 3), y el tubo se somete a centrifugación (p. ej., 50 000 rpm durante 5 h) como se ilustra en el paso 4. Las moléculas de DNA se separan con base en su tamaño (paso 5). *b*) Separación de las moléculas de DNA por sedimentación de equilibrio con base en las diferencias en la composición. La muestra de DNA se mezcla con la solución de CsCl (paso 1) y se somete a centrifugación prolongada (p. ej., 50 000 rpm durante 72 h). El gradiente de CsCl se forma durante la centrifugación (paso 2) y las moléculas de DNA forman bandas en regiones de densidad equivalente (paso 3). *c*) El tubo del experimento *b* se punciona y se permite que el contenido gotee a tubos sucesivos, lo que fracciona el contenido del tubo. Se mide la absorbancia de la solución en cada fracción y se grafica como se muestra.

dos a tres días con fuerzas elevadas). Durante la centrifugación los iones pesados de cesio se dirigen despacio hasta el fondo del tubo y forman un gradiente de densidad continuo en toda la columna de líquido. Después de cierto tiempo la tendencia de los iones de cesio a concentrarse hacia el fondo del tubo se contrarresta con la tendencia contraria para redistribuirse por difusión, y el gradiente se estabiliza. Conforme el gradiente de cesio se forma, las moléculas individuales de DNA se impulsan hacia abajo o se mueven por flotación hacia arriba en el tubo, hasta que llegan a una posición con una densidad de flotación equivalente a la propia, momento en el que ya no experimentan más movimiento. Las moléculas con densidad equivalente forman bandas angostas dentro del tubo. Esta técnica es lo bastante sensible para separar moléculas de DNA con diferente composición de bases (como se ilustra en la figura 18-35*b*) o las que tienen distintos isótopos de nitrógeno (^{15}N contra ^{14}N, como se muestra en la figura 13-3*b*).

18.11 HIBRIDACIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO

La **hibridación de ácido nucleico** comprende varias técnicas relacionadas que se basan en la observación de que dos moléculas de ácido nucleico de cadena sencilla con secuencia de bases complementaria pueden formar un híbrido de doble cadena. Considérese una situación en la que se tiene una mezcla de cientos de fragmentos de DNA de longitud y composición general de bases idénticas que sólo difieren unos de los otros por su secuencia de bases. Por ejemplo, asúmase que uno de los fragmentos de DNA constituye una porción del gen para la globina beta y el resto contiene genes no relacionados. La única manera de distinguir entre el fragmento que codifica el polipéptido globina beta y todos los demás es realizar un experimento de hibridación molecular con moléculas complementarias como sondas.

En el presente ejemplo la incubación de la mezcla de fragmentos de DNA desnaturalizados con una cantidad excesiva de mRNA para globina beta llevaría a los fragmentos de globina a formar híbridos DNA-RNA de cadena doble, mientras los demás fragmentos de DNA quedan en cadenas sencillas. Los híbridos DNA-RNA podrían separarse de los fragmentos de cadenas sencillas en varias formas. Por ejemplo, la mezcla podría pasarse por una columna de hidroxiapatita bajo condiciones iónicas en las que los híbridos se unieran con las sales de fosfato de calcio de la columna, mientras que las moléculas de DNA sin hibridar pasarían sin unirse. Entonces los híbridos de la colum-

na podrían liberarse mediante el incremento en la concentración del amortiguador de lavado.

Los experimentos que utilizan la hibridación de ácidos nucleicos requieren la incubación de dos poblaciones de ácidos nucleicos complementarios de cadena sencilla en condiciones (fuerza iónica, temperatura, etc.) que promuevan la formación de moléculas de cadena doble. Según el tipo de experimento realizado, las dos poblaciones de moléculas en reacción podrían estar presentes en solución, o una población podría inmovilizarse, por ejemplo, por la localización dentro de un cromosoma (como en la figura 10-19).

En muchos casos una de las poblaciones de ácidos nucleicos de cadena sencilla que se emplea en el experimento de hibridación se encuentra dentro de un gel. Considérese una población de fragmentos de DNA que se prepararon a partir de DNA genómico y se fraccionaron por electroforesis en gel (fig. 18-36). Para llevar a cabo la hibridación, el gel se trata a fin de hacer al DNA monocatenario; éste se transfiere entonces del gel a una membrana de nitrocelulosa y se fija en la membrana por calentamiento a 80°C en vacío. El procedimiento por el que se transfiere DNA a la membrana se denomina *transferencia* (*manchado*). Una vez que el DNA se une, la membrana se incuba con una sonda de DNA (o RNA) de cadena sencilla y con marca radiactiva capaz de formar híbridos con un grupo complementario de fragmentos. Luego la radiactividad libre se elimina y la localización de la sonda unida se determina por autorradiografía, como se muestra en la figura 18-36. El experimento recién descrito que se muestra en la figura 18-36 se conoce como *método Southern* (en honor de Edwin Southern, su creador). Con el método de transferencia de Southern pueden identificarse uno o unos cuantos fragmentos de restricción de DNA que contienen una secuencia particular de nucleótidos, aun si el gel contiene miles de fragmentos no relacionados. La figura 10-18 presenta un ejemplo de transferencia de Southern. Las moléculas de RNA también pueden separarse por electroforesis e identificarse con una sonda marcada de DNA después de transferirse a una membrana. La figura 11-36 ilustra un ejemplo de este procedimiento, llamado *método Northern.*

Las sondas de DNA pueden etiquetarse de varias maneras. Una sonda radiactiva incorpora un isótopo radiactivo (como ^{32}P) en uno o más sitios de la molécula. La presencia de la sonda se detecta por autorradiografía, como se muestra en la figura 18-36. Las sondas también pueden etiquetarse con fluoróforos y detectarse por fluorescencia. Otra etiqueta de uso común es la biotina, una molécula orgánica pequeña que puede unirse de manera covalente al esqueleto de DNA. La biotina es detectada por la proteína avidina (o por estreptavidina), que se une a ella con fuerza. La avidina misma debe marcarse para la detección, por ejemplo con un fluoróforo como se muestra en las figuras 10-19 y 10-22.

La hibridación de ácido nucleico también puede proporcionar una medida de la similitud en la secuencia de nucleótidos entre dos muestras de DNA, como podría obtenerse de dos organismos distintos, por ejemplo. Entre más distante sea la

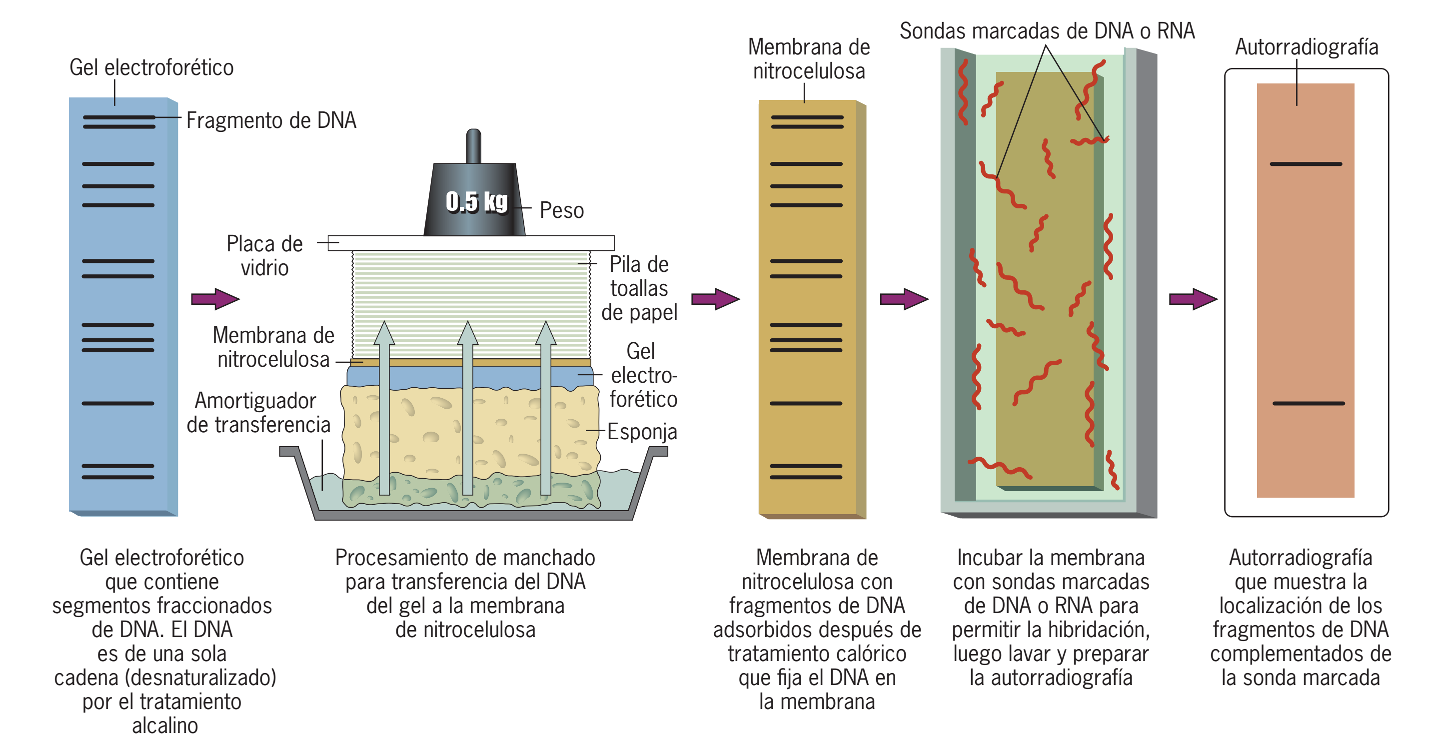


FIGURA 18-36 Identificación de la localización de fragmentos de DNA específicos en un gel por el método Southern. Como se describe en la figura, los fragmentos fraccionados de DNA se desnaturalizan y transfieren a una membrana de nitrocelulosa, que se incuba con sondas de DNA (o RNA) con marca radiactiva. La localización de los fragmentos híbridos se realiza mediante autorradiografía. Durante el procedimiento de manchado, la acción capilar atrae al amortiguador hacia arriba a las toallas de papel. Conforme el amortiguador se mueve por el gel electroforético, disuelve los fragmentos de DNA y los transfiere a la superficie de la membrana adyacente.

relación evolutiva entre las dos especies, mayor es la divergencia en sus secuencias de DNA. Si DNA purificados de las especies A y B se mezclan juntos, se desnaturalizan y se permite que formen hélices de nuevo, un porcentaje de las cadenas dobles de DNA se forman con cadenas de DNA de las dos especies. Como contienen bases discrepantes, estas cadenas dobles son menos estables que las formadas con cadenas de DNA de la misma especie y la inestabilidad se refleja en la menor temperatura en la que se disuelven. Cuando se permite que DNA de distintas especies formen de nuevo hélices dobles en diferentes combinaciones, la temperatura de fusión (T_m, pág. 402) de las cadenas dobles híbridas proporciona una medida de la distancia evolutiva entre los organismos. Dos tipos importantes más de protocolos de hibridación de ácidos nucleicos se describen con detalle en el texto: la *hibridación in situ* en la página 407 y la hibridación en *microseries de cDNA* en la página 515.

18.12 SÍNTESIS QUÍMICA DE DNA

En el análisis de hibridación se requiere el uso de moléculas de ácido nucleico monocatenarias como sondas. Otras técnicas fundamentales para la manipulación y el análisis de DNA en el laboratorio también requieren de moléculas de ácido nucleico monocatenarias cortas, u oligonucleótidos. La síntesis química de DNA y RNA es por tanto una tecnología de apoyo clave para muchos procedimientos.

Las reacciones químicas que unen nucleótidos se han automatizado, y en la actualidad la síntesis de oligonucleótidos se realiza mediante máquinas controladas por computadora conectadas a depósitos de reactivos. El operario teclea en la computadora la secuencia de nucleótidos deseada y mantiene una dotación de los materiales en el instrumento. El oligonucleótido se ensambla un nucleótido a la vez desde el extremo 3′ al 5′ de la molécula, hasta un total de alrededor de 100 nucleótidos. Es posible incorporar en las moléculas modificadores como biotina y fluoróforos. Si se requiere una molécula de doble cadena, se sintetiza como dos cadenas complementarias que pueden unirse entre sí por hibridación. Se forman moléculas sintéticas más largas ensamblando segmentos y uniéndolos.

El desarrollo de técnicas químicas para la síntesis de polinucleótidos con una secuencia de bases específica fue iniciado por H. Gobind Khorana a principios del decenio de 1960 como parte de un intento de descifrar el código genético. Khorana y sus colaboradores siguieron depurando sus técnicas, y una década después de su trabajo inicial con el código, tuvieron éxito en sintetizar un gen de tRNA para tirosina bacteriana, incluida la región promotora no transcrita. El gen, que totalizaba 126 pares de bases, fue ensamblado a partir de más de 20 segmentos, cada uno de los cuales se sintetizó individualmente y luego se unió por medios enzimáticos. Este gen artificial se introdujo luego en células bacterianas que portaban mutaciones para este tRNA, y el DNA sintético fue capaz de restablecer la función hasta entonces deficiente. El primer gen sintetizado químicamente que codificaba una proteína de tamaño promedio, el interferón humano, se ensambló en 1981, en un esfuerzo que requirió la síntesis y el ensamblaje de 67 fragmentos distintos para producir un solo dúplex de 514 pares de bases el cual contenía señales de inicio y término reconocidas por la polimerasa de RNA bacteriana.

En 2002, Eckard Wimmer y colegas de la *New York State University* en Stony Brook sintetizaron de la nada un poliovirus infeccioso. Los investigadores obtuvieron la secuencia de 7 741 nucleótidos del virus de RNA a partir de bases de datos públicas, ordenaron por correo una serie de oligonucleótidos y los ensamblaron para generar una copia en DNA del genoma vírico. Introdujeron el DNA en extractos celulares, donde se transcribió y tradujo. El RNA vírico y las proteínas se ensamblaron en partículas capaces de infectar y matar ratones. La noticia fue aclamada como un logro tecnológico y criticada como un posible hito para terroristas dispuestos a crear armas biológicas. El debate resultante hizo que los editores de revistas científicas concordaran en que era necesario considerar las implicaciones de seguridad de la investigación antes de hacerla pública.

18.13 TECNOLOGÍA DE DNA RECOMBINANTE

En los últimos 30 años se realizaron grandes avances en el análisis de los genomas eucariotas. Este progreso comenzó cuando los biólogos moleculares aprendieron a construir moléculas de **DNA recombinante**, que son moléculas que contienen secuencias de DNA derivadas de más de una fuente. El DNA recombinante puede usarse en multitud de formas. Para empezar se considerará una de las aplicaciones más importantes: el aislamiento del genoma de un segmento particular de DNA que codifica un polipéptido determinado. No obstante, resulta necesario considerar primero una clase de enzimas cuyo descubrimiento y uso han hecho posible la formación de moléculas de DNA recombinante.

Endonucleasas de restricción

Durante el decenio de 1970 se encontró que las bacterias contenían nucleasas que reconocían secuencias cortas de nucleótidos dentro de un DNA doble y dividían la columna central del DNA en sitios específicos en ambas cadenas de la hélice doble. Estas enzimas se conocen como **endonucleasas de restricción** o sólo *enzimas de restricción*. Reciben este nombre porque en las bacterias funcionan para destruir el DNA vírico que pudiera entrar a la célula, lo que *restringe* el crecimiento de los virus. La bacteria protege su propio DNA del ataque nucleolítico mediante la metilación de las bases en los sitios susceptibles, una modificación química que bloquea la acción de la enzima.

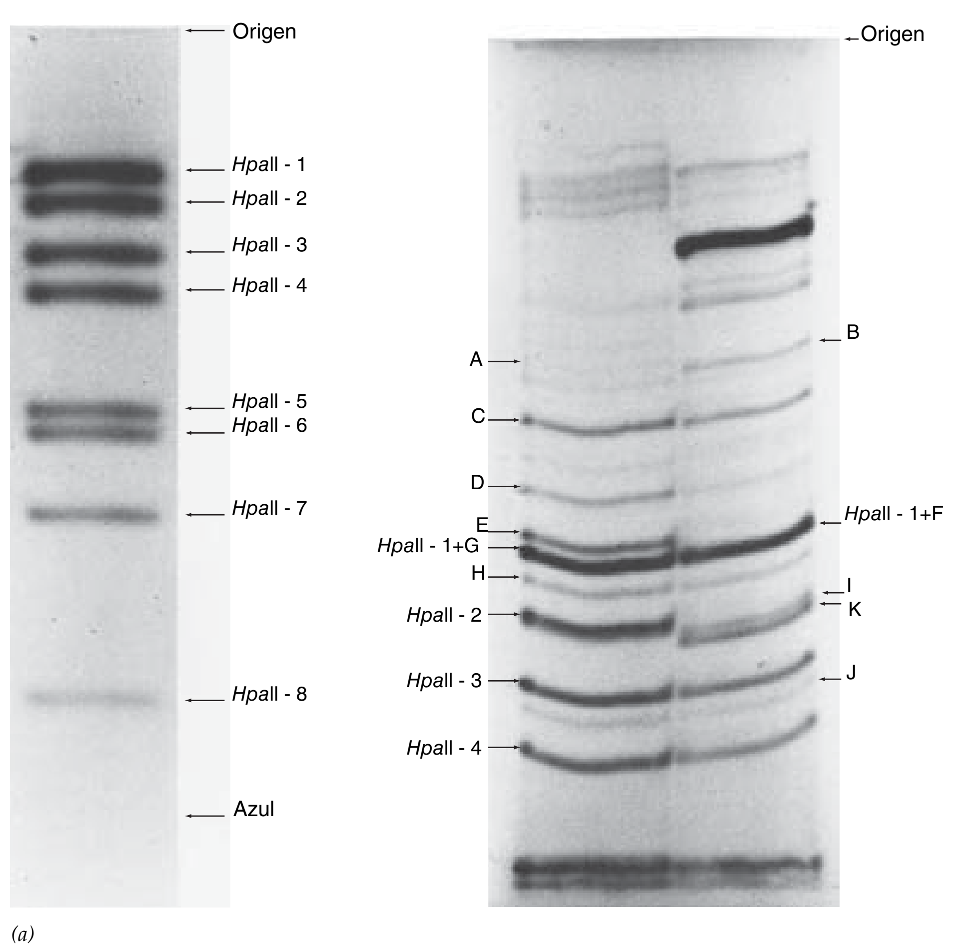
Se aíslan enzimas de varios cientos de organismos procariotas distintos que, en conjunto, reconocen más de 100 secuencias de nucleótidos diferentes. Las secuencias que la mayoría de las enzimas reconocen miden cuatro a seis nucleótidos de largo y se caracterizan por un tipo particular de simetría interna. Considérese la secuencia particular reconocida por la enzima *Eco*R1:

3′—CTTAA↓G— 5′
5′—G↑AATTC— 3′

Se dice que este segmento de DNA tiene *simetría rotatoria doble* porque puede girarse 180° sin que la secuencia de bases cambie. Por tanto, si la secuencia se lee en la misma dirección (3′ a 5′ o

5′ a 3′) en cualquiera de las cadenas se encuentra el mismo orden de bases. Una secuencia con este tipo de simetría se llama *palíndromo*. Cuando la enzima *Eco*R1 ataca este palíndromo, rompe cada cadena en el mismo sitio *de la secuencia*, indicado con las flechas entre los residuos A y G. Los puntos rojos señalan las bases metiladas de esta secuencia que protegen el DNA del hospedador contra el ataque enzimático. Algunas enzimas de restricción tienen enlaces opuestos entre sí en ambas cadenas, lo que produce extremos romos, mientras que otras, como *Eco*R1, hacen cortes escalonados.

El descubrimiento y la purificación de las enzimas de restricción son invaluables en los avances logrados por los biólogos moleculares durante los últimos años. Puesto que es muy frecuente que una secuencia particular de cuatro a seis nucleótidos se produzca por casualidad, cualquier tipo de DNA es susceptible a la fragmentación por estas enzimas. El uso de las enzimas de restricción permite disecar el DNA del genoma humano, o de cualquier otro organismo, en un conjunto bien definido de fragmentos específicos. Una vez que el DNA de un individuo particular se digiere con una de estas enzimas, los fragmentos



(a)

(b)

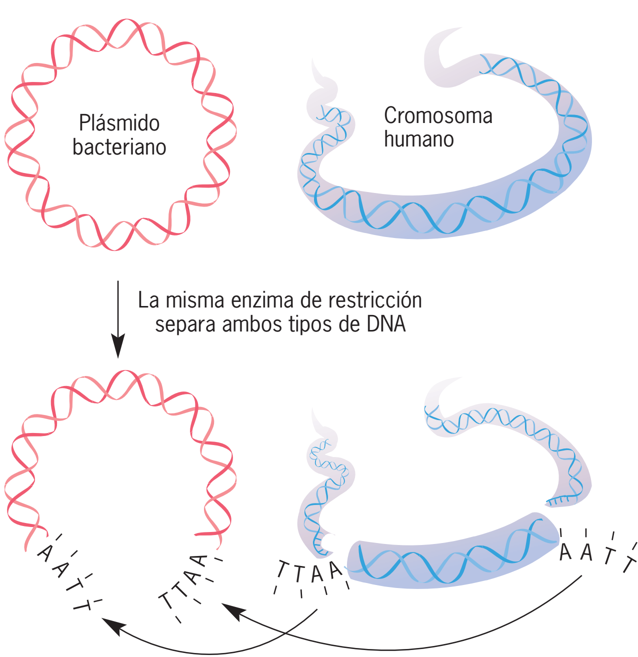
FIGURA 18-37 Construcción de un mapa de restricción del pequeño genoma circular del virus tumoral de DNA del polioma. *a*) Autorradiografías de fragmentos de DNA marcados con ^{32}P que se sometieron a electroforesis en gel. El gel del lado izquierdo muestra el patrón de los fragmentos de DNA obtenidos después de la digestión completa del genoma de polioma con la enzima *Hpa*II. Para determinar cómo se reúnen estos ocho fragmentos para conformar el genoma intacto es necesario tratar el DNA de tal manera que se generen fragmentos superpuestos. La superposición de fragmentos puede producirse mediante el tratamiento del genoma intacto con una segunda enzima que divide la molécula en sitios diferentes o por el tratamiento del genoma con la misma enzima en condiciones distintas en las que el DNA no se digiera por completo como sucedió en el gel de la izquierda. Las dos muestras de la derecha representan ejemplos de digestiones parciales del genoma del polioma con *Hpa*II. El gel central muestra los fragmentos generados por la digestión parcial del DNA circular superhelicoidal y el gel de la derecha muestra los fragmentos *Hpa*II formados después que el genoma circular se convierte en una molécula lineal por acción de *Eco*R1 (una enzima que sólo hace un corte en el círculo). *b*) Mapa de restricción del genoma de polioma alineado con base en la división hecha con *Hpa*II. Se ilustran los ocho fragmentos de la digestión completa junto con el DNA en la parte superior. Los fragmentos superpuestos de la digestión parcial se muestran en su disposición ordenada por debajo del mapa. (Los fragmentos L y M migran al fondo del gel en la parte *a*, lado derecho.) (TOMADA DE BEVERLY E. GRIFFIN, MIKE FRIED Y ALLISON COWIE, PROC NAT'L ACAD SCI U.S.A. 71:2078, 1974.)

obtenidos pueden seccionarse con base en la duración de la electroforesis en gel (como en la figura 18-37*a*). Las diferentes enzimas separan la misma preparación de DNA en conjuntos distintos de fragmentos y los sitios dentro del genoma que las diversas enzimas separan pueden identificarse y ordenarse en un mapa de restricción como el que se muestra en la figura 18-37*b*.

Formación de DNA recombinante

Los DNA recombinantes pueden formarse de varias maneras. En el método que se muestra en la figura 18-38 las moléculas de DNA de dos fuentes distintas se tratan con una enzima de restricción que hace cortes escalonados en la cadena doble de DNA. Los cortes escalonados dejan colas cortas de una sola cadena que actúan como "extremos pegajosos" que pueden unirse con una cola complementaria de una cadena en otra molécula de DNA para restaurar una molécula de cadena doble. Los fragmentos que formarán la molécula recombinante son plásmidos bacterianos en el caso mostrado en la figura 18-38. Los plásmidos son pequeñas moléculas circulares de DNA de cadena doble que se separan del cromosoma bacteriano principal. El otro fragmento de DNA de la figura 18-38 se obtiene de células humanas después del tratamiento con la misma enzima de restricción empleada para abrir el plásmido. Cuando los fragmentos de DNA y el plásmido se incuban juntos en presencia de una ligasa de DNA, los dos tipos de DNA se unen mediante enlaces de hidrógeno por sus extremos pegajosos para formar recombinantes de DNA circulares, como en la figura 18-38. Paul Berg, Herbert Boyer, Annie Chang y Stanley Cohen de la *Stanford University* y de la *California University*, en San Francisco, formaron las primeras moléculas de DNA recombinante con este método básico en 1973, con lo que marcaron el nacimiento de la ingeniería genética moderna.

Con el procedimiento recién descrito se produce una gran cantidad de moléculas recombinantes distintas, cada una de las cuales contiene un plásmido bacteriano con un DNA humano incorporado en su estructura circular (véase fig. 18-39). Supóngase que se tiene interés en aislar un solo gen del genoma humano, por ejemplo, el que codifica la insulina. Como el objetivo es obtener una preparación purificada del tipo de DNA recombinante que contiene el fragmento que codifica la insulina, este fragmento debe separarse de todos los demás. Esto se hace mediante un proceso llamado clonación de DNA. Se regresará a la investigación del gen de la insulina después de describir la metodología que permite la clonación de DNA.



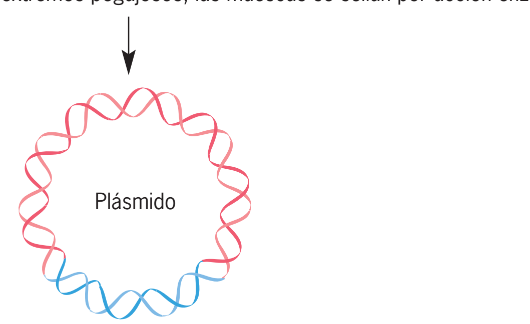


FIGURA 18-38 Formación de una molécula de DNA recombinante. En este ejemplo una preparación de plásmidos bacterianos se trata con una enzima de restricción que hace un solo corte dentro de cada plásmido bacteriano. Esta misma enzima de restricción se usa para fragmentar una preparación de DNA genómico humano en pequeños fragmentos. Como se trataron con la misma enzima de restricción, el DNA del plásmido dividido y los fragmentos de DNA humano tienen extremos pegajosos. Cuando estas dos poblaciones se incuban juntas, las dos moléculas de DNA se unen en forma covalente entre sí y luego se sellan también en forma covalente con la ligasa de DNA, para formar una molécula de DNA recombinante.

Clonación de DNA

La **clonación de DNA** es una técnica para producir grandes cantidades de un segmento de DNA específico. El segmento de DNA que se clona se une primero con un *DNA vector*, que es un vehículo para transportar el DNA extraño a una célula hospedadora adecuada, como la bacteria *E. coli*. El vector contiene secuencias que le permiten replicarse dentro de la célula hospedadora. A menudo se utilizan dos tipos de vectores para clonar DNA dentro de hospedadores bacterianos. En una de las técnicas el segmento de DNA que va a clonarse se introduce en la célula bacteriana mediante la unión de éste con un plásmido, como se describió antes, para luego inducir a la célula bacteriana a captar el plásmido del medio. En una técnica alternativa el segmento de DNA se une con una porción del genoma del virus bacteriano lambda (λ), que luego se permite que infecte un cultivo de células bacterianas para producir gran cantidad de virus, cada uno de los cuales contiene el segmento ajeno de DNA. De cualquier manera, una vez que el segmento de DNA está dentro de una bacteria, se replica junto con el DNA bacteriano (o vírico) y se reparte en las células hijas (o partículas víricas producidas). Por tanto, el número de moléculas de DNA recombinante aumenta en proporción con el número de células bacterianas (o progenie vírica) que se forman. De un solo plásmido recombinante o genoma vírico dentro de una sola célula bacteriana pue-

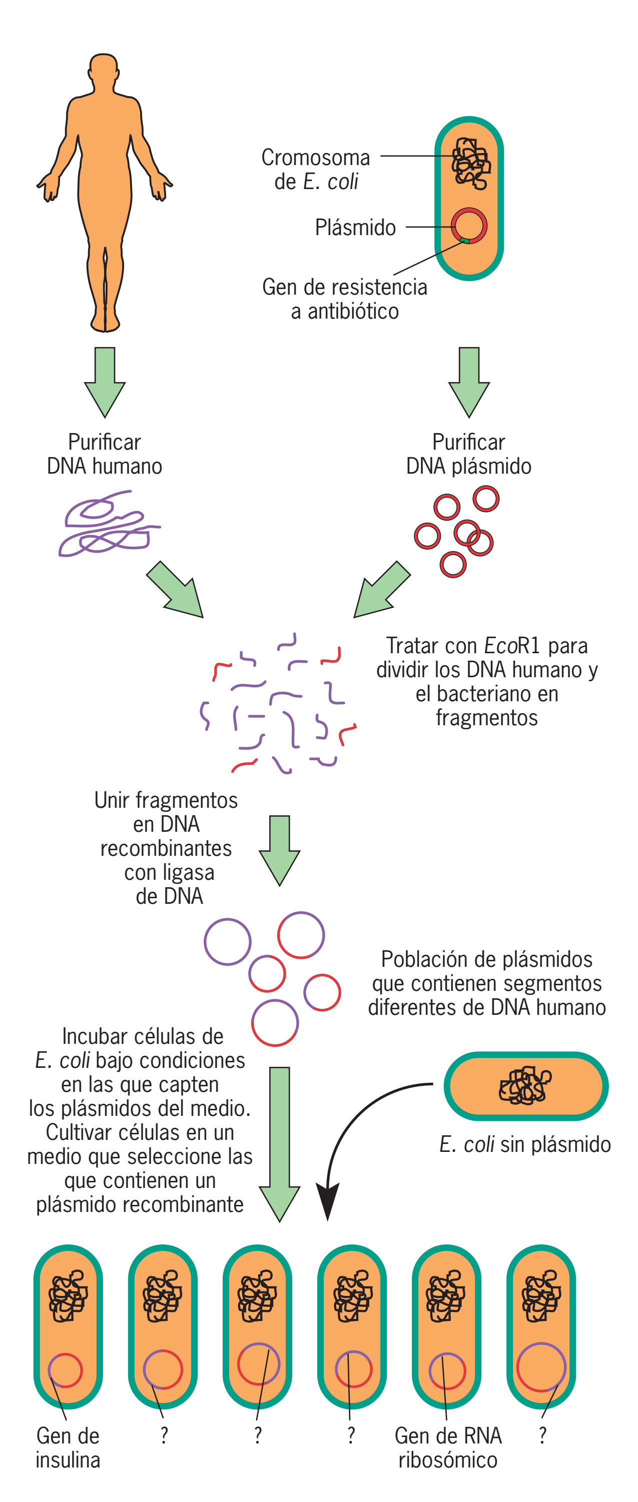


FIGURA 18-39 Un ejemplo de clonación de DNA con plásmidos bacterianos. El DNA se extrae de células humanas, se fragmenta con *Eco*R1 y los fragmentos se insertan en una población de plásmidos bacterianos. Se cuenta con técnicas para prevenir la formación de plásmidos que carecen del inserto de DNA ajeno. Una vez que la célula bacteriana captó un plásmido recombinante del medio, la célula da origen a una colonia de células que contienen la molécula de DNA recombinante. En este ejemplo la mayoría de las bacterias contienen DNA eucariotas con función desconocida (marcados como ?), mientras que uno contiene una porción del DNA que codifica RNA ribosómico y otro contiene DNA que codifica insulina.

den formarse millones de copias del DNA en un periodo corto. Una vez que la cantidad de DNA se amplificó lo suficiente, el DNA recombinante puede purificarse y usarse en otros procedimientos. Además de proporcionar un medio para amplificar la cantidad de una secuencia de DNA particular, la clonación también puede emplearse para aislar una forma pura de cualquier segmento de DNA en una población grande y heterogénea de moléculas de DNA. Se comenzará con la descripción de la clonación de DNA con plásmidos bacterianos.

Clonación de DNA eucariota en plásmidos bacterianos

El DNA ajeno que va a clonarse se inserta primero en el plásmido para formar una molécula de DNA recombinante. Los plásmidos que se utilizan para la clonación de DNA son versiones modificadas de los que se encuentran en las células bacterianas. Como sus contrapartes naturales de las que provienen, estos plásmidos contienen un origen de replicación y uno o más genes que constituyen la célula receptora resistente a uno o más antibióticos. La resistencia a los antibióticos permite a los investigadores seleccionar las células que contienen el plásmido recombinante.

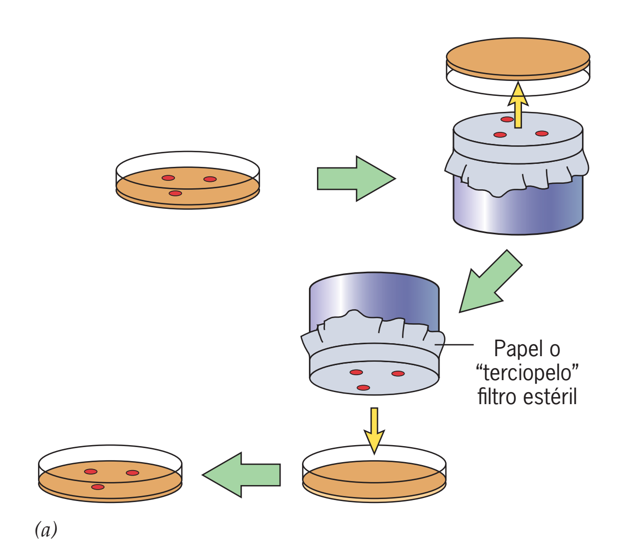
Como demostraron Avery, Macleod y McCarty (pág. 423) por primera vez, las células bacterianas pueden captar DNA de su medio. Este fenómeno establece la base para la clonación de plásmidos en las células bacterianas (fig. 18-39). En la técnica más usual los plásmidos recombinantes se agregan a un cultivo bacteriano que se trató antes con iones de calcio. Cuando se someten a un breve golpe de calor, tales bacterias se estimulan para que capten DNA del medio. Por lo general sólo un pequeño porcentaje de células son competentes para captar y retener una de las moléculas de plásmido recombinantes. Una vez que se capta, el plásmido se replica en forma autónoma en la célula receptora y se pasa a la progenie durante la división celular. Las bacterias que contienen un plásmido recombinante pueden seleccionarse de entre otras mediante el crecimiento de las células en presencia del antibiótico para el que confiere resistencia el gen en el plásmido.

Esta descripción se comenzó con el objetivo de aislar un pequeño fragmento de DNA que contiene la secuencia para el gen de la insulina. Hasta este punto se ha formado una población de bacterias que contienen muchos plásmidos recombinantes distintos, muy pocos de los cuales albergan el gen que se busca (como en la figura 18-39). Uno de los mayores beneficios de la clonación del DNA consiste en que, además de producir grandes cantidades de moléculas particulares de DNA, permite separar los diferentes DNA de una mezcla. Antes se mencionó que las bacterias que contienen plásmidos pueden seleccionarse entre aquellas sin plásmidos mediante el tratamiento con antibióticos. Una vez que esto se realiza, las células que tienen el plásmido pueden crecer a bajas densidades en cajas de Petri de manera que la progenie de cada célula (un clon de células) permanece separada de la progenie de otras células. Como una gran cantidad de plásmidos recombinantes diferentes estaban al principio en el medio, las distintas células situadas en la caja contienen diferentes fragmentos de DNA ajenos. Una vez que las células que contienen varios plásmidos crecen en colonias separadas, el investigador puede buscar entre las colonias las pocas que contienen el gen que busca, en este caso el gen de insulina.

Las cajas de cultivo que contienen colonias bacterianas (o placas de fagos) se revisan para detectar la presencia de una

secuencia de DNA particular con técnicas combinadas de *chapado de réplica e hibridación in situ.* Como se ilustra en la figura 18-40*a*, el chapado de la réplica permite preparar muchas cajas con representantes de las mismas colonias bacterianas en el mismo sitio preciso de cada caja. Una de las placas réplica se usa luego para localizar la secuencia de DNA que se busca (fig. 18-40*b*), un procedimiento que requiere que las células se destruyan y el DNA se fije en la superficie de una membrana de nailon o nitrocelulosa. Una vez que el DNA se fija, se desnaturaliza como preparación para la hibridación in situ, durante la cual la membrana se incuba con una sonda de DNA de cadena sencilla marcada que contiene la secuencia complementaria que se busca. Después de la incubación, la sonda que no formó híbridos se lava de la membrana y la localización de los híbridos marcados se identifica mediante autorradiografía. Los representantes vivos de los clones identificados pueden encontrarse en sitios correspondientes en las placas originales y es posible cultivar estas células para obtener colonias más grandes, lo que sirve para amplificar el plásmido de DNA recombinante.

Tras alcanzar la amplificación deseada, se cosechan las células, se extrae el DNA y el DNA de plásmido recombinante se separa con facilidad del cromosoma mucho más grande por medio de varias técnicas, entre ellas la centrifugación de equilibrio (fig. 18-41). Los plásmidos recombinantes aislados pueden tratarse luego con la misma enzima de restricción que se empleó en su formación, lo que libera los segmentos clonados de DNA



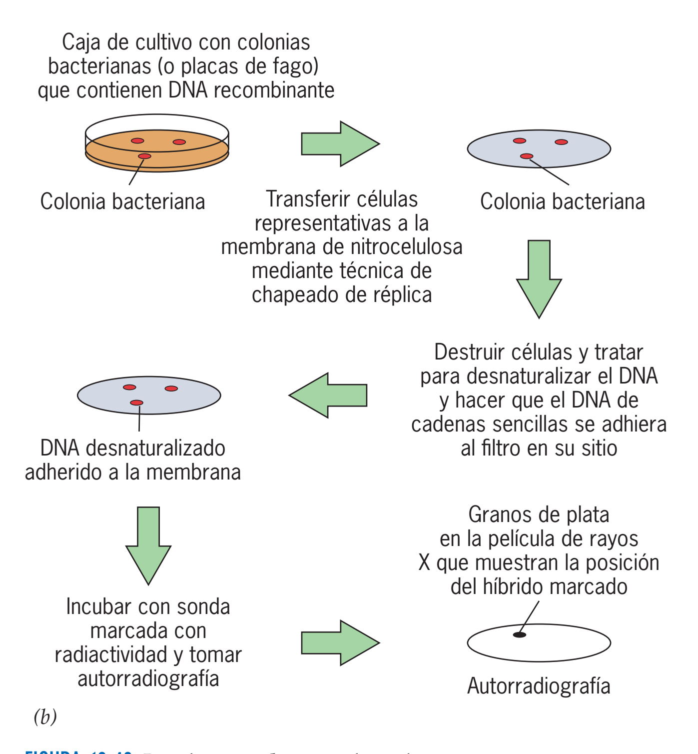


FIGURA 18-40 Localización de una colonia bacteriana que contiene una secuencia deseada de DNA por chapado de réplica e hibridación in situ. *a*) Una vez que las células bacterianas que se chaparon en la caja de cultivo se convirtieron en colonias, la caja se invierte sobre un trozo de papel filtro y se permite que el papel absorba algunas de las células de cada colonia. Cajas vacías se inoculan luego al presionar contra ellos el papel filtro a fin de reproducir placas réplica. *b*) Procedimiento para revisar las células de una caja de cultivo en busca de las colonias que contengan el DNA recombinante de interés. Una vez que las colonias relevantes se identifican, las células pueden retirarse de la caja original y cultivarse por separado para producir grandes cantidades de los fragmentos del DNA que se busca.

FIGURA 18-41 Separación del DNA del plásmido del DNA del cromosoma bacteriano principal mediante centrifugación de equilibrio con CsCl. Puede verse que este tubo de centrifugación contiene dos bandas, una de DNA del plásmido que tiene un segmento de DNA ajeno que se clonó dentro de las bacterias y la otra contiene DNA cromosómico de estas mismas bacterias. Los dos tipos de DNA se separaron durante la centrifugación (fig. 18-35*b*). El investigador retira el DNA del tubo con aguja y jeringa. El DNA del tubo se hace visible con el compuesto de unión con DNA bromuro de etidio, que produce fluorescencia bajo luz ultravioleta. (FOTOGRAFÍA DE TED SPEIGEL/CORBIS IMAGES.)

del resto del DNA que sirvió como vector. Entonces el DNA clonado puede separarse del plásmido por centrifugación.

Clonación de DNA eucariota en genomas de fagos Otro vector de clonación importante es el bacteriófago lambda, que se muestra en la figura 18-42. El genoma lambda es una molécula lineal de DNA de cadena doble de unas 50 kb de largo. La cepa modificada que se utiliza en la mayoría de los experimentos de clonación contiene dos sitios de división para la enzima *Eco*R1, la cual fragmenta el genoma en tres segmentos grandes. De manera conveniente toda la información esencial para la infección y la lisis celular está contenida en los dos segmentos exteriores, por lo que el fragmento dispensable del centro puede reponerse con un fragmento de DNA de hasta unas 25 kb. Las moléculas de DNA recombinante pueden empacarse en cabezas de fagos in vitro y estas partículas de fago creadas por ingeniería genética pueden usarse para infectar bacterias hospedadoras. (Las moléculas de DNA de fago que carecen del inserto son demasiado cortas para empacarse.) Una vez en la bacteria, el DNA eucariota se amplifica junto con el DNA vírico y luego se empaca en una nueva generación de partículas víricas que se liberan cuando la célula se destruye. Las partículas liberadas infectan nuevas células y pronto se ve una mancha clara (o *placa*) en el "prado" bacteriano en el sitio de infección. Cada placa contiene millones de partículas de fago, cada una con una sola copia del mismo fragmento de DNA eucariota.

El fragmento lambda es atractivo como vector de clonación por muchas razones: 1) el DNA se empaca bien en una forma en la que es fácil de almacenar y extraer; 2) todo paquete que contenga un DNA recombinante es capaz de infectar una célula bacteriana, y 3) una sola caja de Petri puede contener más de 100 000 placas diferentes. Luego que las placas de fagos se forman, el fragmento particular de DNA que se busca se identifica mediante un proceso similar de chapado de réplica e hibridación in situ descrito en la figura 18-40 para la clonación de los plásmidos recombinantes.

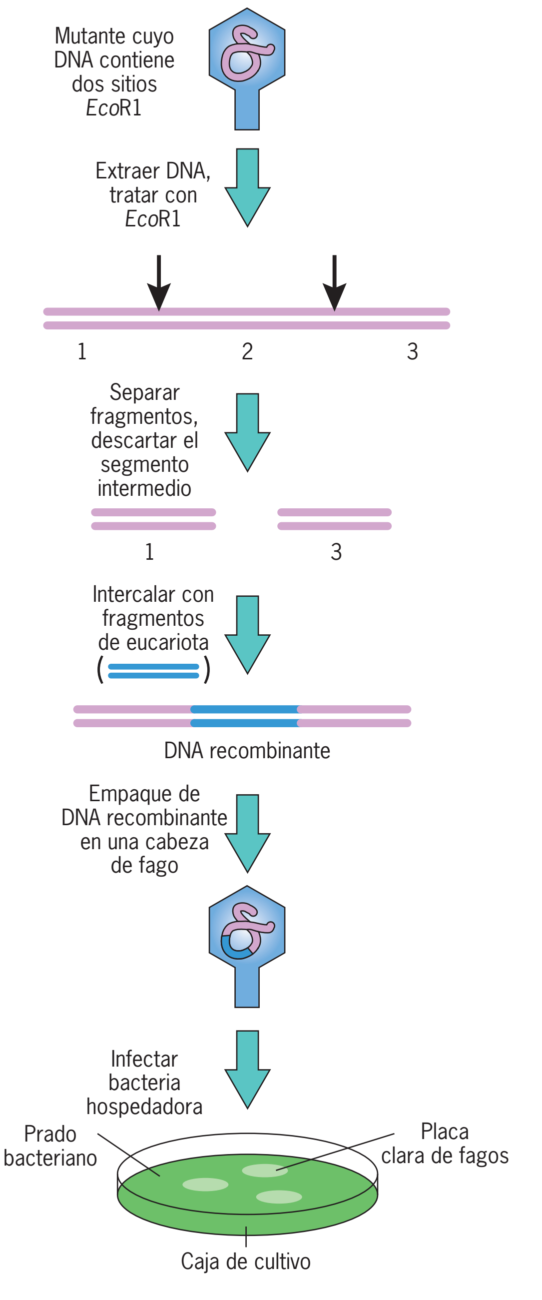


FIGURA 18-42 Protocolo para la clonación de fragmentos de DNA eucariota en un fago lambda. Los pasos se describen en el texto.

18.14 AMPLIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE DNA POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

En 1983, Kary Mullis de Cetus Corporation concibió una nueva técnica que ahora se emplea mucho para amplificar fragmentos específicos de DNA sin la necesidad de células bacterianas. Esta reacción se conoce como **reacción en cadena de la polimerasa** (**PCR**). Muchos protocolos diferentes de PCR se usan para una multitud de aplicaciones en las que es posible amplificar desde uno hasta una gran población de DNA relacionados. La amplificación por PCR es fácil de adaptar a los moldes de RNA si primero se les convierte en DNA complementarios, con transcriptasa inversa.

La figura 18-43 muestra el procedimiento básico que se utiliza en la PCR. La técnica emplea una polimerasa de DNA termoestable llamada *polimerasa Taq*, que al principio se aisló de *Thermus aquaticus*, una bacteria que vive en manantiales calientes a temperaturas mayores de 90°C. En el protocolo más sencillo, una muestra de DNA se mezcla con una alícuota de polimerasa *Taq* y los cuatro desoxirribonucleótidos, junto con un gran exceso de dos fragmentos sintéticos cortos de DNA (oligonucleótidos) que son complementarios de las secuencias de DNA en los extremos 3′ de la región del DNA que va a amplificarse. Los oligonucleótidos sirven como cebadores (pág. 548) a los que se agregan los nucleótidos durante los pasos siguientes de replicación. Luego la mezcla se calienta a unos 95°C, que es lo bastante caliente para hacer que las moléculas de DNA de la muestra se separen en sus dos cadenas componentes. A continuación la mezcla se enfría a unos 60°C para permitir que los cebadores se unan con las cadenas del DNA blanco y la temperatura se eleva

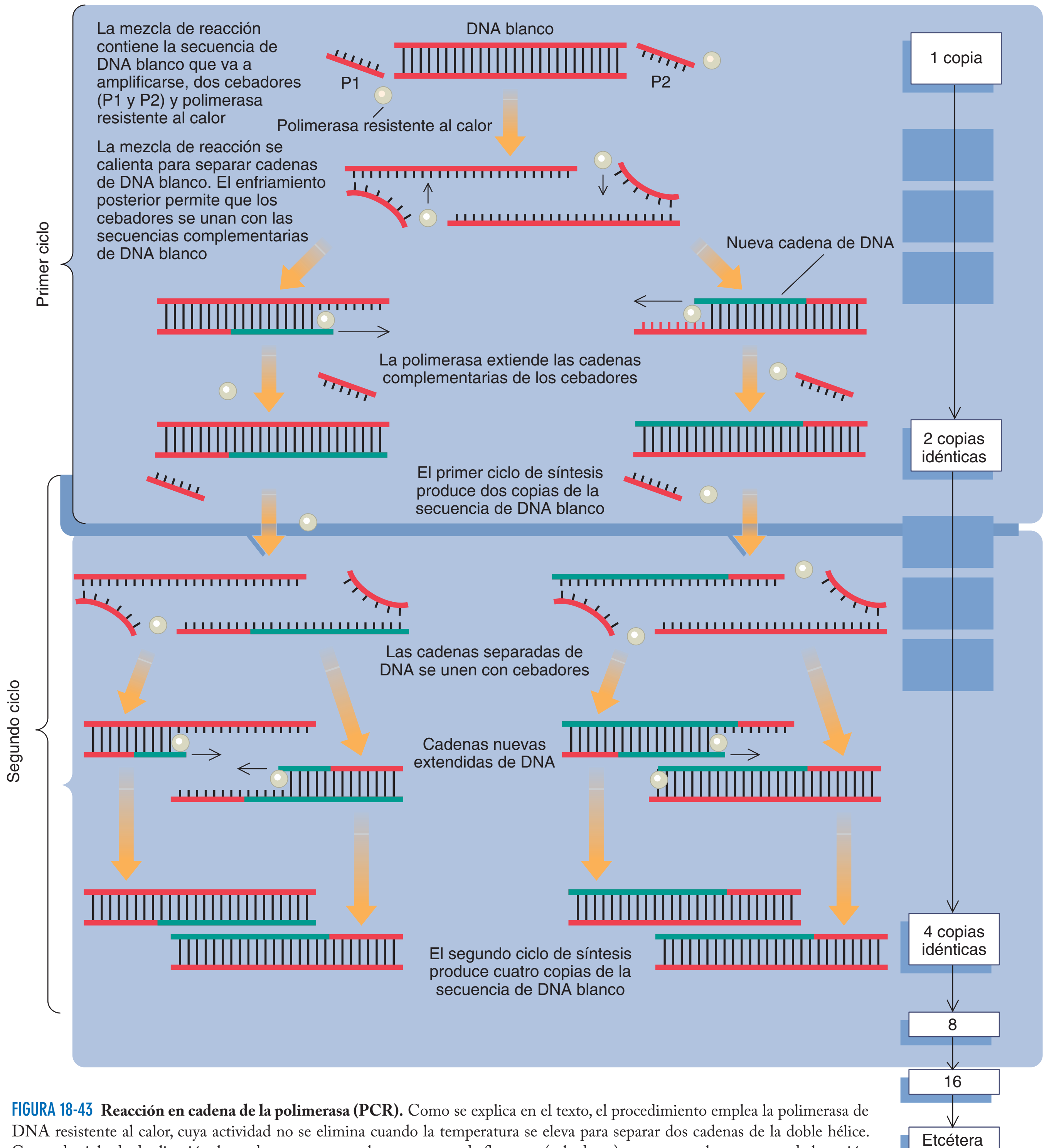


FIGURA 18-43 **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Como se explica en el texto, el procedimiento emplea la polimerasa de DNA resistente al calor, cuya actividad no se elimina cuando la temperatura se eleva para separar dos cadenas de la doble hélice. Con cada ciclo de duplicación, las cadenas se separan, los segmentos de flanqueo (cebadores) se unen con los extremos de la región seleccionada y la polimerasa copia el segmento intermedio.

de nuevo a 72°C para que la polimerasa termofílica agregue nucleótidos al extremo 3′ de los iniciadores. Conforme la polimerasa extiende el cebador, copia de manera selectiva el DNA blanco y forma nuevas cadenas de DNA complementario. La temperatura se eleva de nuevo, lo que hace que las cadenas de DNA recién formadas y las originales se separen. Enseguida se enfría la muestra para permitir que los cebadores sintéticos de la muestra se unan de nuevo con el DNA blanco, que ahora está

presente en una cantidad dos veces mayor que la original. Este ciclo se repite una y otra vez, y en cada ronda se duplica la cantidad de la región específica del DNA que está flanqueado por los cebadores unidos. Pueden generarse miles de millones de copias de esta región específica en unas cuantas horas con un *generador de ciclos térmicos* que cambia la temperatura de la mezcla de reacción en forma automática para permitir que cada paso del ciclo ocurra.

Aplicaciones de la PCR

Amplificación de DNA para clonación o análisis Desde su invención, la PCR ha encontrado muchos usos. Puede generar muchas copias de un fragmento de DNA específico antes de clonarlo, lo que constituye un método eficiente si la secuencia objetivo se conoce con suficiente detalle para que sea posible especificar la secuencia de nucleótidos de dos iniciadores complementarios. Esto reviste especial utilidad en casos en que el DNA original es muy escaso, dado que la PCR puede generar grandes cantidades de DNA a partir de muestras diminutas, como la que hay en una sola célula. La PCR se ha usado en investigaciones criminales para generar cantidades de DNA a partir de una mancha de sangre seca en la ropa de un sospechoso o aun del DNA presente en parte de un solo folículo piloso dejado en la escena de un crimen. Con este fin se seleccionan regiones del genoma para amplificar que sean muy polimórficas (esto es, que varíen con gran frecuencia en la población), de modo que no haya dos individuos que tengan los mismos fragmentos de DNA valorados (como en la figura 10-18). Este mismo procedimiento puede usarse para estudiar fragmentos de DNA de fósiles bien conservados que pueden tener millones de años de antigüedad. La actividad de la polimerasa de DNA en la PCR también se emplea en la secuenciación de DNA (véase sección 18.15).

Investigación de la presencia de secuencias de DNA específicas Supóngase que se desea determinar si una muestra de tejido contiene o no un virus dado. Podría responderse a esto mediante una hibridación de fragmentos de DNA (hibridación Southern) (pág. 757) o mediante la PCR. En este último caso, se aísla ácido nucleico de la muestra y se añaden iniciadores de PCR complementarios al DNA vírico, junto con los otros reactivos de la PCR. Entonces se permite que proceda la reacción. Si el genoma vírico está presente en la muestra, los iniciadores de PCR se hibridarán con él y la PCR generará un producto. Si el virus no está presente, los iniciadores de PCR no se hibridarán y no se generará producto. Así, en esta aplicación, la PCR misma sirve como el sistema de detección.

Comparación de moléculas de DNA Si dos moléculas de DNA tienen la misma secuencia de bases, generarán los mismos productos de la PCR en reacciones con iniciadores idénticos. Esta es la premisa para ensayos rápidos en que se compara la similitud de dos muestras de DNA, por ejemplo, DNA genómico de aislados bacterianos. La PCR se realiza en las muestras usando varios iniciadores, que pueden estar diseñados específicamente o generarse al azar. Los productos se separan por electroforesis en gel y se comparan. Cuanto más similares las secuencias de los genomas bacterianos, tanto más idénticos serán sus productos de PCR.

Cuantificación de plantillas de DNA o RNA La PCR también puede usarse para determinar cuánto de una secuencia específica de nucleótidos (DNA o RNA) está presente en una muestra mixta. En un método para esta PCR cuantitativa se usa la unión de un colorante específico para DNA bicatenario a fin de cuantificar la cantidad de producto bicatenario que se genera. La rapidez de acumulación de producto es proporcional a la cantidad de plantilla presente en la muestra.

En otro método se usa lo que ha dado en llamarse “faros moleculares”. Se trata de oligonucleótidos indicadores cortos con un fluorocromo unido a un extremo y una molécula supresora al otro y que se hibridan a la mitad de la secuencia blanco por amplificar. Mientras el oligonucleótido corto está intacto, el fluorocromo y el supresor están lo suficientemente cerca para que la fluorescencia se suprima. Cuando la polimerasa de DNA sintetiza una nueva cadena de DNA complementaria a la plantilla, su actividad de exonucleasa (pág. 554) degrada el oligonucleótido indicador. Por tanto, el fluorocromo se separa del supresor y emite fluorescencia. La cantidad de fluorocromo que se libera en un ciclo de PCR dado es directamente proporcional al número de moléculas de plantilla que la polimerasa copia.

18.15 SECUENCIACIÓN DE DNA

Para 1970 ya estaba identificada la secuencia de una larga lista de proteínas, aunque aún no se lograba progreso alguno en la identificación de la secuencia de nucleótidos en el DNA. Varias razones explicaban este estado de las cosas. A diferencia de las moléculas de DNA, los polipéptidos tienen longitudes definidas y manejables; una especie determinada de polipéptido podía purificarse con facilidad; se disponía de varias técnicas para dividir el polipéptido en varios sitios a fin de producir fragmentos superpuestos, y la presencia de 20 aminoácidos diferentes con propiedades muy diversas hacía que la separación y la identificación de la secuencia de los péptidos pequeños fuera una tarea simple. A mediados del decenio de 1970 se produjo una revolución en la tecnología para identificación de secuencia del DNA. Para 1977 se publicó la secuencia completa de nucleótidos de un genoma vírico completo, el de ϕX174, de unos 5 375 nucleótidos de largo. Este hito en la biología molecular se produjo en el laboratorio de Frederick Sanger, quien identificó la primera secuencia de aminoácidos de un polipéptido (insulina) unos 25 años antes.

En 1970 se hubiera necesitado más de un año para identificar la secuencia de un fragmento de DNA de unas cuantas docenas de nucleótidos de largo; 15 años más tarde, la misma tarea podía hacerse en un solo día. En los primeros días, la secuenciación solía realizarla manualmente una persona que trabajaba en una mesa del laboratorio y que también leía e interpretaba los resultados de las reacciones. En la actualidad, ese proceso suele efectuarse en una serie de procedimientos automatizados en instalaciones centralizadas que secuencian cientos de muestras al día. Los resultados se interpretan por computadora y se almacenan en bases de datos fáciles de analizar con software ampliamente disponible. No es sorprendente que con estos avances tecnológicos haya llegado una avalancha de datos de secuencias, incluidas secuencias genómicas completas de ser humano, perro (una bóxer hembra), gato doméstico, pollo,

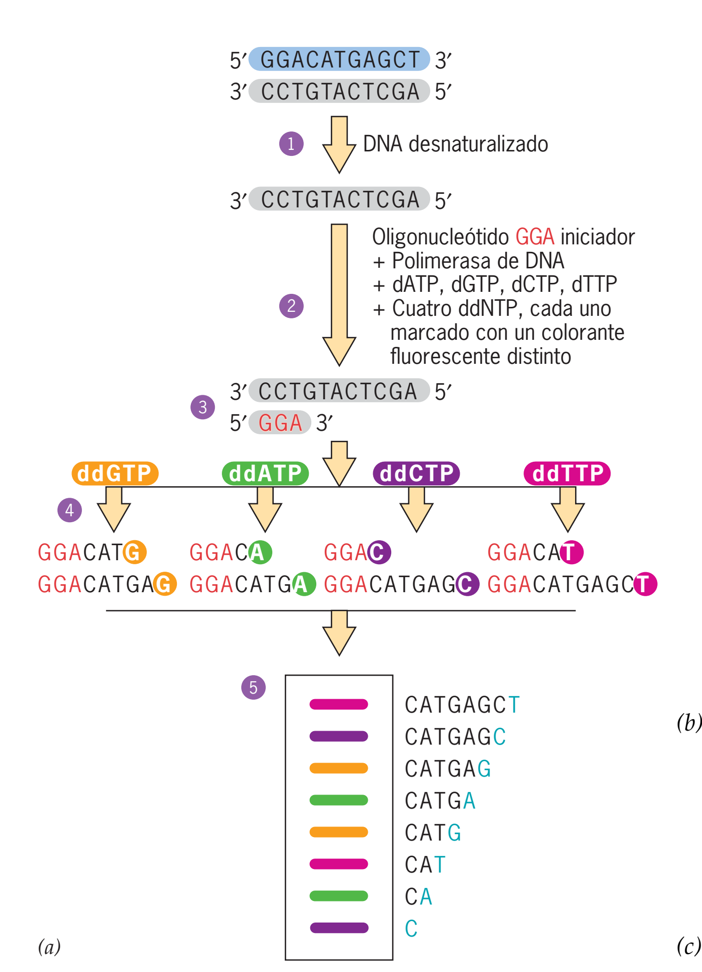
ratón, rata, varios insectos, hongos y muchas bacterias. El número y la lista crecen continuamente.

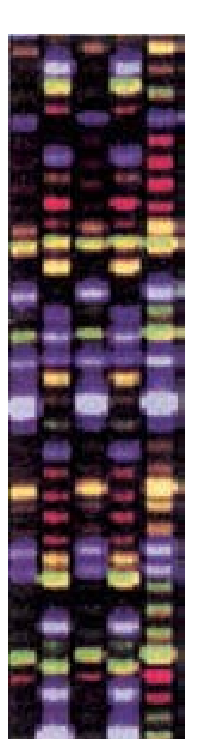
Estos avances en la secuenciación de DNA fueron posibles gracias a desarrollos en varias áreas: métodos moleculares para la secuenciación de DNA, instrumentación susceptible de automatizarse, computadoras más potentes y fáciles de adquirir, y software para análisis de datos. La clave inicial fue el desarrollo de métodos para determinar la secuencia de fragmentos de DNA. Este avance en sí fue posible por el descubrimiento de enzimas de restricción y el desarrollo de tecnologías de clonación, que aportaron los medios necesarios para crear un fragmento de DNA definido en cantidades suficientes para ejecutar los procedimientos bioquímicos necesarios.

A mediados del decenio de 1970 se desarrollaron casi simultáneamente dos metodologías de secuenciación de DNA: un método químico adoptado por Alan Maxam y Walter Gilbert de la *Harvard University*, y una estrategia enzimática creada por Sanger y A. R. Coulson del *Medical Research Council* en Cambridge, Inglaterra. El método de Sanger-Coulson se convirtió en el más usado. Después del desarrollo de la PCR, el procedimiento de secuenciación de Sanger-Coulson y la PCR se fusionaron en una técnica de secuenciación que combina la bioquímica de Sanger-Coulson con los ciclos repetitivos y la automatización de la PCR. Esta llamada secuenciación de ciclo es ahora el método más empleado, y se le describe brevemente. La figura 18-44 muestra los pasos básicos.

Este procedimiento inicia con una población de moléculas plantilla idénticas, ya sea un producto de PCR o un fragmento de DNA clonado. El DNA plantilla se mezcla con un iniciador que es complementario al extremo 3′ de una cadena de la región por secuenciar. Si la plantilla es un producto de PCR, el iniciador de secuenciación puede ser uno (pero sólo uno) de los iniciadores de la PCR. La mezcla de reacción también contiene la polimerasa de DNA termoestable *Taq*, los cuatro precursores trifosfato de desoxirribonucleósido (dNTP) y una baja concentración de precursores modificados llamados *trifosfatos de didesoxirribonucleósido* (*ddNTP*). Cada ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP) se ha modificado por la adición de un colorante fluorescente de distinto color a su extremo 3′.

La reacción de secuenciación da comienzo, como la PCR, cuando la mezcla se calienta a una temperatura que hace que las dos cadenas plantilla se desnaturalicen (fig. 18-44*a*, paso 1). Después, la reacción se enfría de modo que el iniciador pueda hibridarse con el DNA plantilla (paso 2). Debe hacerse notar que, en comparación con lo que ocurre en la PCR, sólo está presente un iniciador, de modo que sólo una de las dos cadenas de DNA plantilla puede hibridarse con un iniciador. En el paso 3, la polimerasa *Taq* se agrega al extremo del iniciador dNTP





(c)

FIGURA 18-44 Secuenciación de DNA. *a*) Pasos básicos en la identificación de la secuencia de un pequeño fragmento hipotético mediante la técnica de Sanger-Coulson (didesoxi), como se describen en el texto. *b*) Carriles de gel en que las moléculas hijas con marca fluorescente se separaron. El color de la banda es determinado por la identidad del didesoxinucleótido en el extremo 3′ de la cadena de DNA. *c*) La secuencia de nucleótidos en la cadena plantilla se interpreta en una computadora que "lee" de abajo hacia arriba en el gel, usando como entrada la intensidad y la longitud de onda de la luz fluorescente. La computadora genera un "electroferograma" que muestra la intensidad y el color de la fluorescencia detectada, junto con la interpretación de la secuencia de DNA. (*B* y *C*, reimpresas con autorización de Leroy Hood y David Galas, Nature 421:445, 2003; © 2003, Macmillan Magazines Ltd.).

complementarios a la molécula plantilla, de modo que se sintetiza una nueva cadena de DNA complementaria. De cuando en cuando, la polimerasa inserta un ddNTP en vez de un dNTP. Los didesoxirribonucleótidos carecen del grupo hidroxilo en sus posiciones 2′ y 3′. Una vez que estos nucleótidos se han incorporado al extremo de una cadena creciente, la falta de OH 3′ imposibilita a la polimerasa para que agregue otro nucleótido, lo que causa la terminación de la cadena (fig. 18-44, paso 4). Como el ddNTP está presente en mucha menor concentración en la mezcla de reacción que el dNTP correspondiente, la incorporación del ddNTP es infrecuente y aleatoria; puede incorporarse cerca del principio de una cadena, próximo a la parte intermedia de otra o hasta el final de la tercera cadena. En cualquier caso, cuando el ddNTP se incorpora, el crecimiento de la cadena cesa en ese punto.

Una vez que la fase de extensión de la cadena se ha completado, la temperatura vuelve a elevarse para desnaturalizar las nuevas moléculas de DNA bicatenarias. El ciclo de hibridación, síntesis y desnaturalización se repite muchas veces, generando una gran población de cadenas de DNA hijas que hasta ahora incluye moléculas en las cuales se ha incorporado un ddNTP en cada posición. Por ejemplo, por cada A en la cadena plantilla habrá una cadena hija que termine en un ddTTP en esa posición. Cuando todos los ciclos se completan, los productos de reacción se separan por electroforesis en gel en capilares muy finos (fig. 18-44, paso 5).

La electroforesis en gel de alta resolución puede separar fragmentos que difieren en sólo un nucleótido de largo. Por ejemplo, si el fragmento inicial contenía 100 nucleótidos, entonces cada una de las 100 moléculas hijas marcadas emigrará a un punto diferente en el gel, donde la molécula más corta migrará más lejos. Cada banda sucesiva en el gel contendrá moléculas hijas con un nucleótido más que la predecesora. Dado que cada ddNTP se marcó con un colorante fluorescente único, el color de la banda (vista bajo radiación UV) revela la identidad del nucleótido terminal en cada molécula hija (fig. 18-44*b*). El orden de los colores en el gel corresponde por tanto a la secuencia de bases de la molécula plantilla.

Las reacciones de Sanger-Coulson pueden realizarse sin la adaptación de la PCR, en cuyo caso sólo se ejecuta una ronda de síntesis de DNA. En estas circunstancias es necesario usar más DNA plantilla. Las reacciones también pueden efectuarse con un iniciador marcado en lugar de ddNTP marcado. Éste fue el método original usado por Sanger y Coulson, y los iniciadores se marcaron radiactivamente. En este caso, la secuenciación debe programarse como cuatro reacciones independientes, en las cuales sólo uno de los cuatro ddNTP se añade a cada una. Los productos de las cuatro reacciones se corren lado a lado en carriles de gel adyacentes, y la secuencia plantilla se determina mirando los cuatro carriles para determinar cuál de ellos (A, G, C o T) contiene la siguiente molécula hija.

Una vez que se ha determinado la secuencia de nucleótidos de un segmento de DNA, es posible emplear diversas herramientas de software para analizarla. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos codificada por el DNA puede determinarse y compararse con otras secuencias de aminoácidos conocidas para obtener información acerca de la posible función del polipéptido. La secuencia de aminoácidos también aporta indicios respecto a la estructura terciaria de la proteína, en particular las partes del polipéptido que podrían actuar como segmentos que cruzan la membrana de proteínas integrales de membrana. La secuencia de nucleótidos misma también puede compararse con otras conocidas. Tales comparaciones pueden usarse para evaluar la relación o historia evolutiva de las secuencias de DNA, para identificar el fragmento de DNA que acaba de secuenciarse, o para comparar las características genómicas de diversos organismos o individuos.

18.16 GENOTECAS DE DNA

A menudo la clonación de DNA se usa para producir **genotecas de DNA**, que son colecciones de fragmentos de DNA clonados. Pueden crearse dos tipos básicos de genotecas de DNA: genotecas genómicas y genotecas de cDNA. Las *genotecas genómicas* se producen de un DNA total extraído de núcleos y contienen todas las secuencias de DNA de la especie. Una vez que disponen de una genoteca genómica de una especie, los investigadores pueden utilizar esta colección para aislar secuencias específicas de DNA, como las que contienen el gen para la insulina humana. Por otro lado, las *genotecas de cDNA* provienen de copias de DNA de una población de RNA. Por lo general las genotecas de cDNA se producen a partir de RNA mensajeros presentes en una célula particular, por lo que corresponden a los genes que están activos en ese tipo de célula.

Genotecas genómicas

Primero se examinará la producción de una biblioteca genómica (catálogo genómico o genoteca). En una técnica, el DNA genómico se trata con una o dos enzimas de restricción que reconocen secuencias de nucleótidos muy cortas en condiciones de baja concentración enzimática, de manera que sólo un pequeño porcentaje de los sitios susceptibles se divida. Dos enzimas usuales que reconocen secuencias de cuatro nucleótidos son *Hae*III (reconoce GGCC) y *Sau*3A (reconoce GATC). Se esperaría que hubiera un tetranucleótido determinado por casualidad con una frecuencia tan alta que cualquier segmento de DNA de tamaño considerable sea sensible a la fragmentación. Una vez que el DNA se digiere en forma parcial, el material digerido se fracciona por electroforesis en gel o centrifugación con gradiente de densidad y los fragmentos de tamaño adecuado (p. ej., 20 kb de largo) se incorporan en las partículas de fago lambda. Estos fagos se emplean para generar el millón de placas necesarias para asegurar que cada segmento individual de un genoma de mamífero esté representado.

Como el DNA se trata con enzimas en condiciones en las que la mayoría de los sitios susceptibles no se dividen, para fines prácticos el DNA se fragmenta al azar. Una vez que los recombinantes de fagos se producen, pueden almacenarse para usarlos más adelante y, como tal, constituyen una colección permanente de todas las secuencias de DNA presentes en el genoma de la especie. Siempre que un investigador desee aislar una secuencia particular de la genoteca, las partículas de fago pueden cultivarse en bacterias y las diversas placas (cada una originada por la infección de un solo fago recombinante) revisarse para detectar la secuencia mediante hibridación in situ.

El uso de DNA dividido al azar tiene una ventaja en la construcción de una genoteca porque genera fragmentos superpuestos que pueden ser útiles en el análisis de regiones de una

secuencia particular, una técnica conocida como *marcha de cromosomas*. Por ejemplo, si se aísla un fragmento que contiene la región codificadora de un gen para globina, ese fragmento particular puede marcarse y usarse como sonda para buscar en la genoteca genómica fragmentos con los que se superponga. El proceso se repite luego con nuevos fragmentos como sondas marcadas en pasos de detección sucesivos, mientras se aísla en forma gradual una parte cada vez más larga de la molécula de DNA original. Esta técnica permite estudiar la organización de secuencias vinculadas en una región extensa de un cromosoma.

Clonación de fragmentos más grandes de DNA en vectores de clonación especializados Ni los vectores plásmidos ni los fagos lambda son adecuados para la clonación de DNA mayores de 20 a 25 kb de largo. Se han desarrollado varios vectores que permiten a los investigadores clonar segmentos mucho más grandes de DNA. Uno de los más importantes de estos vectores es el **cromosoma artificial de levadura** (**YAC**), que puede aceptar segmentos de DNA ajeno de hasta 1 000 kb (un millón de pares de bases). Como su nombre lo indica, los YAC son versiones artificiales de un cromosoma normal de levadura. Contienen todos los elementos de un cromosoma de levadura requeridos para replicar la estructura durante la fase S y separarla entre las células hijas durante la mitosis, inclusive uno o más orígenes de replicación, telómeros en los extremos de los cromosomas y un centrómero al que las fibras del huso pueden unirse durante la separación del cromosoma. Además de estos elementos, los YAC se construyen para que contengan: 1) un gen cuyo producto codificado permita a las células que contienen el YAC seleccionarse entre las que carecen de tal elemento y 2) el fragmento de DNA a clonar. Como otras células, las levaduras pueden captar DNA de su medio, lo que proporciona el medio para introducir los YAC a las células. En los últimos años los laboratorios participantes en la identificación de la secuencia de los genomas dependen mucho de un vector alternativo de clonación, el **cromosoma artificial bacteriano** (**BAC**), que también puede aceptar grandes fragmentos de DNA (de hasta 500 kb). Los BAC son plásmidos bacterianos especializados (factores F) que contienen un origen bacteriano de replicación y los genes necesarios para regular su propia replicación. Los BAC tienen ventaja sobre los YAC en proyectos para identificar secuencias a alta velocidad porque pueden clonarse en *E. coli*, que capta con facilidad el DNA exógeno, tienen un tiempo de generación extremadamente corto, pueden cultivarse en grandes densidades en medios simples y no "corrompen" el DNA clonado por recombinación.

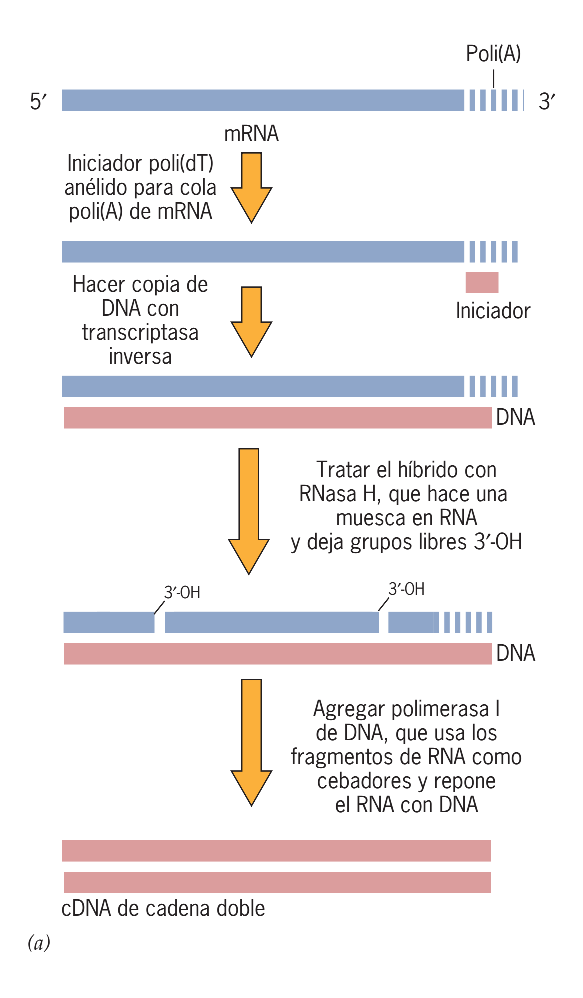
Los fragmentos de DNA clonados en YAC y BAC casi siempre son mayores de 100 kb de largo. Los fragmentos tan grandes suelen producirse mediante tratamiento de DNA con enzimas de restricción que reconocen secuencias de nucleótidos muy largos (siete a ocho nucleótidos) que contienen dinucleótidos CG. Como se señala en la página 529, los dinucleótidos CG tienen funciones especiales en el genoma de los mamíferos, y se supone que por eso no aparecen tan a menudo como se esperaría que sucediera por casualidad. Por ejemplo, la enzima de restricción *Not*1 que reconoce la secuencia de ocho nucleótidos GCGGCCGC, por lo general divide el DNA de mamíferos en fragmentos con varios cientos de miles de pares de bases de largo. Los fragmentos de esta longitud pueden incorporarse en YAC o BAC y clonarse dentro de levaduras o bacterias hospedadoras.

Genotecas de cDNA

Hasta este punto la descripción se limitó a la clonación de fragmentos de DNA aislados del DNA extraído, es decir, fragmentos genómicos. Cuando se trabaja con DNA genómico, por lo general se busca aislar un gen o una familia de genes particulares entre cientos de miles de secuencias no relacionadas. Además, el aislamiento de los fragmentos genómicos permite estudiar diversos temas, entre ellos: 1) secuencias reguladoras que flanquean la porción codificadora del gen; 2) secuencias intermedias no codificadoras; 3) varios miembros de una familia de múltiples genes que a menudo están muy cercanos en el genoma; 4) la evolución de las secuencias de DNA, inclusive su duplicación y recombinación como se ve en comparaciones del DNA de diferentes especies, y 5) el intercalado de elementos genéticos transferibles.

A diferencia del DNA genómico, la clonación de cDNA también es importante en el análisis de la estructura génica y la expresión de los genes. Para producir genotecas de cDNA se aísla una población de RNA mensajeros y se utiliza como un molde para que la transcriptasa inversa forme una población de híbridos DNA-RNA, como se muestra en la figura 18-45*a*. Los híbridos DNA-RNA se convierten en una población de cDNA de cadena doble mediante la formación de muescas en el RNA con la RNasa H y la sustitución con DNA por efecto de la polimerasa I de DNA (pág. 554). El cDNA de cadena doble se combina después con el vector deseado (en este caso un plásmido) y se clona como se muestra en la figura 18-45*b*. Aunque las poblaciones de RNA mensajero suelen contener miles de mensajes diferentes, puede haber especies individuales en cantidades (abundancia) muy distintas. Como resultado, una genoteca de cDNA debe contener alrededor de un millón de clones diferentes de cDNA para asegurar que los mRNA raros se representan. Además, la transcriptasa inversa no es una enzima muy eficiente y tiende a caerse del mRNA modelo antes de terminar el copiado. En consecuencia, a veces resulta difícil obtener una población de cDNA de longitud completa. Como sucede con los experimentos que emplean fragmentos de DNA genómico, los clones deben identificarse para aislar una secuencia particular de una población heterogénea de moléculas recombinantes.

El análisis de cDNA clonado tiene varias funciones. Por lo general es más fácil estudiar una población diversa de cDNA que la población correspondiente de mRNA, de manera que las moléculas de cDNA pueden usarse para aprender acerca de la diversidad y abundancia de mRNA presentes en la célula, el porcentaje de mRNA que dos tipos distintos de células comparten o la variedad de mRNA sujetos a empalme alterno generados a partir de una transcripción primaria específica. Una sola molécula de cDNA clonada y amplificada también es muy útil. El cDNA contiene sólo la información presente en el mRNA, por lo que las comparaciones entre cDNA y su locus genómico correspondiente pueden brindar información respecto a las localizaciones precisas de las secuencias intermedias no codificadoras dentro del DNA. En tareas más prácticas es posible identificar la secuencia del cDNA con facilidad para tomar un atajo en la determinación de la secuencia de aminoácidos de



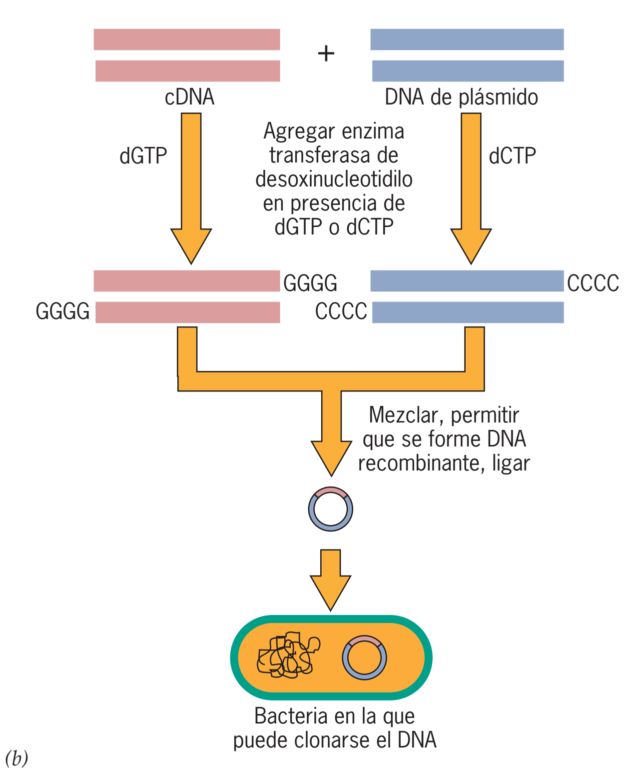


FIGURA 18-45 Síntesis de cDNA para clonación en un plásmido. *a*) En este método de formación de cDNA, un cebador corto poli(dT) se une con el poli(A) de cada RNA mensajero y el mRNA se transcribe por acción de la transcriptasa inversa (que necesita el cebador para iniciar la síntesis de DNA). Una vez que el híbrido DNA-RNA se forma, se producen muescas en el RNA mediante RNasa H y se agrega una polimerasa de DNA para digerir el RNA y sustituir el DNA, justo como ocurre durante la replicación de DNA en una célula bacteriana (pág. 554). *b*) Para preparar cDNA de extremos romos para la clonación se agregan un pequeño fragmento de poli(G) a los extremos 3′ del cDNA y un segmento complementario de poli(C) a los extremos 3′ del DNA plásmido. Los dos DNA se mezclan y se permite que formen recombinantes, que se sellan y usan para transformar las células bacterianas en las que se clonan.

un polipéptido; los cDNA marcados se usan como sondas para detectar secuencias complementarias entre clones recombinantes, y como carecen de intrones, los cDNA tienen ventaja sobre los fragmentos genómicos cuando se pretende sintetizar proteínas eucariotas en cultivos de células bacterianas.

18.17 TRANSFERENCIA DE DNA A CÉLULAS EUCARIOTAS Y EMBRIONES DE MAMÍFERO

En las secciones previas se explicó la manera en que los genes eucariotas pueden aislarse, modificarse y amplificarse. En esta sección se consideran algunas de las forman en que los genes pueden introducirse a las células eucariotas, donde casi siempre se transcriben y traducen. Una de las estrategias más usuales para alcanzar este objetivo es incorporar el DNA en el genoma de un virus que no está en replicación y permitir que el virus infecte una célula. La transferencia de genes mediada por virus se conoce como **transducción**. Según el tipo de virus que se utilice, el gen de interés puede expresarse en forma transitoria durante un lapso de horas a días, o integrarse de modo estable en el genoma de la célula hospedadora. La integración estable suele realizarse por medio de retrovirus modificados, que contienen un genoma de RNA que se transcribe a la inversa en el DNA dentro de la célula. La copia del DNA se inserta después en el DNA de los cromosomas del hospedador. Los retrovirus se utilizan en muchos de los intentos recientes de terapéutica génica para transferir un gen a las células de un paciente que carece de ese gen. En general estas pruebas clínicas no tienen mucho éxito a causa de la baja eficiencia de infección de los vectores víricos actuales.

Se cuenta con varios procedimientos para introducir DNA desnudo en células cultivadas, un proceso llamado **transfección**. Lo más frecuente es que las células se traten con fosfato de calcio o DEAE-dextrano, ya que ambos forman un complejo con el DNA agregado que promueve su adherencia con la superficie celular. Se estima que sólo una de cada 10^5 células capta el DNA y lo incorpora de manera estable en los cromosomas. Aunque no se sabe por qué este pequeño porcentaje de células de la población es competente para transfectarse, las que se transfectan casi siempre captan varios fragmentos. Una manera de seleccionar las células que captaron el DNA ajeno es incluir un gen que

permita a las células transfectadas crecer en un medio determinado en el que las células no transfectadas no sobrevivan. Como las células transfectadas suelen captar más de un fragmento, es necesario que el gen que se emplea para la selección no se localice en el mismo fragmento de DNA que el gen cuya función se investiga (denominado **transgén**).

La electroporación y la lipofección son dos procedimientos más para transfectar células. En la *electroporación*, las células se incuban con DNA en ampolletas especiales que contienen electrodos que aplican un pulso eléctrico breve. La aplicación de corriente ocasiona que la membrana plasmática se vuelva permeable por cierto tiempo a las moléculas de DNA, algunas de las cuales llegan hasta el núcleo y se integran en los cromosomas. En la *lipofección*, las células se tratan con DNA que se une con lípidos de carga positiva (liposomas catiónicos) capaces de fusionarse con la bicapa lipídica de la membrana celular y llevar el DNA al citoplasma.

Una de las formas más directas de introducir genes ajenos a una célula es la microinyección directa de DNA en el núcleo celular. Los núcleos de los oocitos y huevos son muy adecuados para esta técnica. Por ejemplo, los oocitos de *Xenopus* se usan desde hace mucho para estudiar la expresión de genes ajenos. El núcleo del oocito contiene toda la maquinaria necesaria para la síntesis de RNA; cuando se inyecta DNA ajeno en el núcleo, se transcribe con facilidad. Además, las moléculas de RNA sintetizadas a partir de los moldes inyectados se procesan en forma normal y se transportan al citoplasma, donde se traducen en proteínas que pueden detectarse por medios inmunológicos o en virtud de su actividad específica.

Otro blanco favorito para el DNA inyectado es el núcleo de un embrión de ratón (fig. 18-46). El objetivo de estos experimentos es vigilar la expresión del gen en la célula inyectada, pero no que el DNA se integre en los cromosomas del huevo para pasar a todas las células del embrión y el adulto que se forme luego. Los animales que se modificaron mediante ingeniería genética para que sus cromosomas contengan genes extraños se llaman **animales transgénicos** y son un medio para vigilar cuándo y dónde en el embrión se expresan los genes particulares (como en la figura 12-33), además de identificar el impacto de las copias adicionales de genes particulares en el desarrollo y la vida del animal.

Animales y plantas transgénicos En 1981 Ralph Brinster de la *Pennsylvania University* y Richard Palmiter de la *Washington University* tuvieron éxito en la introducción de un gen para la hormona del crecimiento de la rata en los huevos fertilizados de ratón. El DNA inyectado se construyó para que tuviera la porción codificadora del gen para la hormona del crecimiento de la rata en una posición justo siguiente a la región promotora del gen de ratón para la metalotioneína. En condiciones normales la síntesis de metalotioneína se intensifica mucho después de la administración de metales, como el cadmio o el cinc, o de hormonas glucocorticoides. El gen de la metalotioneína tiene un promotor potente y se esperaba que la colocación del gen de la hormona del crecimiento corriente abajo de éste permitiera la expresión del gen después del tratamiento del bloqueo transgénico con metales o glucocorticoides. Como se ilustra en la figura 18-47, esta expectativa se cumplió del todo.

En el aspecto práctico los animales transgénicos constituyen un mecanismo para crear **modelos animales**, que son animales de laboratorio que expresan una enfermedad humana particular a la que en condiciones normales no estarían sujetos.

FIGURA 18-46 Microinyección de DNA en el núcleo de un huevo de ratón recién fertilizado. El huevo se mantiene en su sitio con una pipeta de succión que se muestra a la derecha, mientras que la pipeta de inyección que penetra el huevo se muestra a la izquierda. (Tomada de Thomas E. Wagner, et al., Proc Nat'l Acad Sci U.S.A. 78:6377, 1981.)

FIGURA 18-47 Ratones transgénicos. Esta fotografía muestra un par de hermanos de la misma camada a las 10 semanas de edad. El ratón más grande se desarrolló de un huevo inyectado con DNA que contenía el gen de la hormona del crecimiento de la rata, que se colocó corriente abajo del promotor de metalotioneína. El ratón más grande pesa 44 g; el más pequeño de control no inyectado pesa 29 g. El gen GH de rata se transmitió a los descendientes que también crecieron más que los controles. (Cortesía de Ralph L. Brinster, de un trabajo publicado en R. D. Palmiter, et al., Nature, 300:611, 1982.)

Esta estrategia se ilustra con los ratones transgénicos con un gen que codifica una versión mutante de la proteína precursora amiloide humana (APP). Como se explica en la página 66, estos ratones desarrollan síntomas neurológicos y de comportamiento que recuerdan los de la enfermedad de Alzheimer y son un recurso importante en el desarrollo de tratamientos para esta terrible enfermedad. Los animales transgénicos también se desarrollan como parte de la biotecnología agrícola. Por ejemplo, los cerdos que nacen con genes ajenos para la hormona del crecimiento incorporados en sus cromosomas crecen con mucha menos grasa que los animales control que carecen de los genes. La carne de animales transgénicos tiene menos grasa porque el exceso de hormona del crecimiento estimula la conversión de nutrimentos en proteína en lugar de grasa.

Las plantas también son candidatos importantes para la ingeniería genética. En la página 513 se indicó que pueden cultivarse plantas completas a partir de células vegetales individuales en cultivo. Esto brinda la oportunidad de modificar la composición genética de las plantas mediante la introducción de DNA en los cromosomas de células cultivadas que después pueden crecer hasta plantas maduras. Una forma de introducir genes ajenos consiste en incorporarlos en el *plásmido Ti* de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens.* Fuera del laboratorio, esta bacteria vive en relación con plantas dicotiledóneas, en las que induce la formación de masas tumorales llamadas agallas. Durante una infección, una sección del plásmido Ti llamada *región T-DNA* pasa de la bacteria a la célula vegetal. Esta parte del plásmido se incorpora en los cromosomas de la célula vegetal e induce a la célula a proliferar y proveer nutrimentos a la bacteria.

El plásmido Ti puede aislarse de bacterias y unirse con genes ajenos para producir un plásmido recombinante que las células vegetales dicotiledóneas no diferenciadas en cultivo captan, inclusive las células de zanahorias y tabaco. La figura 18-48 muestra el uso de los plásmidos Ti recombinantes para introducir DNA extraño en las células del meristemo en la punta de los brotes nuevos. Luego los brotes pueden enraizarse y crecer hasta formar plantas maduras. Esta técnica, llamada *transformación T-DNA*, se utiliza para transformar células vegetales con genes derivados de bacterias que codifican toxinas para matar insectos, lo que protege las plantas de los insectos depredadores.

Se dispone de otros procedimientos para introducir genes ajenos en las células de las plantas monocotiledóneas. En una de las estrategias más exóticas, las células vegetales pueden servir como blanco para pelotillas microscópicas de tungsteno cubiertas con DNA que se disparan con una “pistola de genes”. Esta técnica se emplea para modificar el material genético de varios tipos distintos de células vegetales.

Las dos actividades más importantes que los genetistas botánicos podrían mejorar con la ingeniería genética son la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno, ambas funciones bioenergéticas vitales. Cualquier mejoría significativa en la eficiencia fotosintética implicaría grandes aumentos en la producción de cosechas. Se espera que sea posible diseñar una versión modificada de la enzima fijadora de CO_2 menos susceptible a la fotorespiración (pág. 233). La fijación de nitrógeno es una actividad que realizan ciertos géneros de bacterias (p. ej., *Rhizobium*) que viven en relación simbiótica con ciertas plantas (p. ej., soya, cacahuate, trébol, alfalfa y guisantes). Las bacterias se encuentran en protuberancias o *nódulos leguminosos*, localizados en las raíces, donde retiran N_2 de la atmósfera, lo reducen hasta amoniaco y

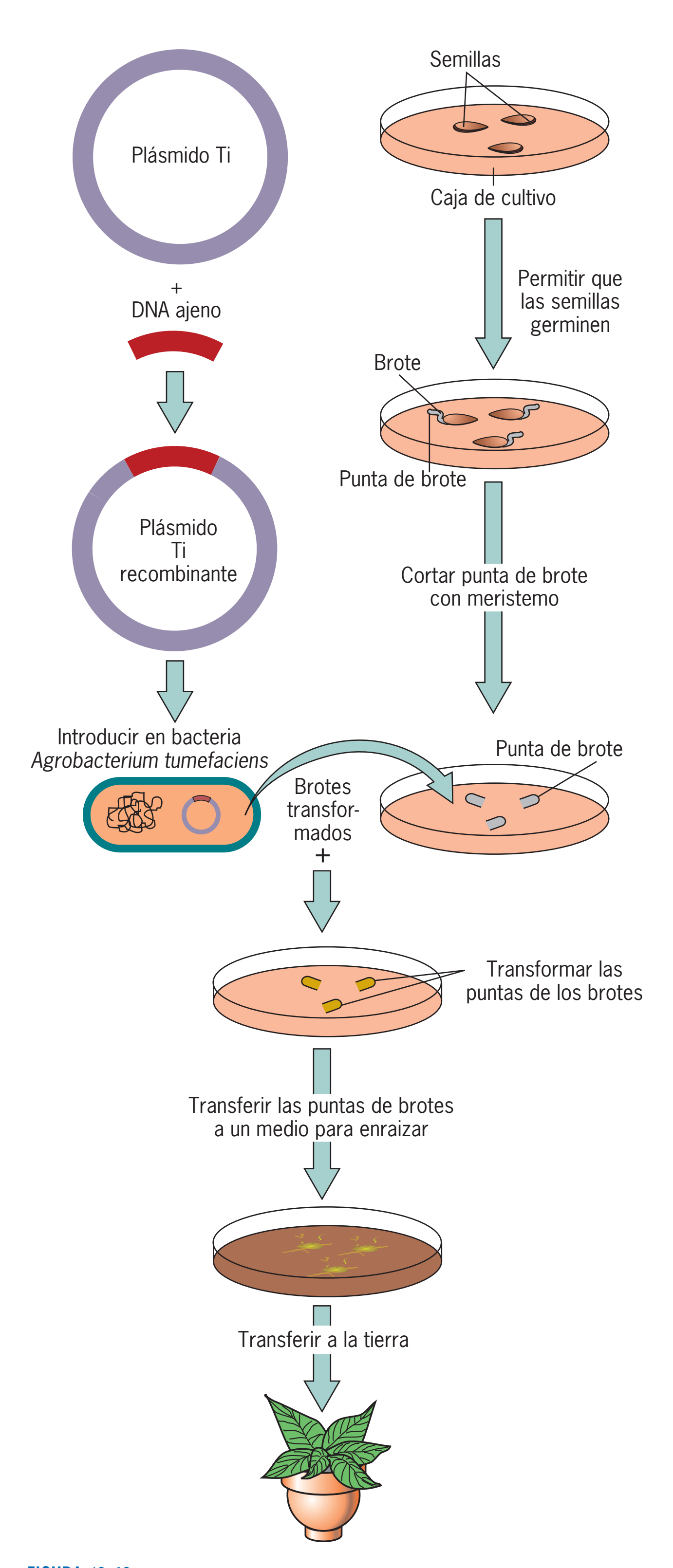


FIGURA 18-48 Formación de plantas transgénicas con el plásmido Ti. El transgén se incluye en el DNA del plásmido Ti, que se reintroduce en la bacteria hospedadora. Las bacterias que contienen el plásmido recombinante se usan luego para transformar células vegetales, en este caso las células del meristemo en el extremo superior de una punta disecada de la raíz. Los brotes transformados se transfieren a un medio de selección, donde desarrollan raíces. Las plantas enraizadas pueden transferirse a tierra.

entregan el producto a las células de la planta. Los genetistas buscan una forma de aislar los genes bacterianos que participan en esta actividad e introducirlos en los cromosomas de las plantas no leguminosas que en la actualidad dependen mucho del fertilizante agregado para obtener sus compuestos de nitrógeno reducido. Una alternativa sería alterar el genoma de la planta o la bacteria para que nuevos tipos de relaciones simbióticas puedan desarrollarse.

18.18 DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN DE GENES EUCARIOTAS POR ELIMINACIÓN GÉNICA

Hace muy poco los investigadores descubrieron nuevos genes y aprendieron acerca de su función mediante la detección de mutantes que presentaban fenotipos anormales (véase la página 281 respecto al estudio de la secreción de proteínas). La existencia de los genes se evidenció sólo a través del proceso de mutación. Este proceso de aprendizaje de los genotipos mediante el estudio del fenotipo mutante se conoce como *genética anterógrada*. A partir del desarrollo de técnicas para la clonación de genes y la identificación de la secuencia del DNA los investigadores han podido identificar y estudiar los genes en forma directa sin conocer nada acerca de la función de su proteína codificada. Esta condición se ha vuelto muy usual en los últimos años con la identificación de la secuencia de genomas enteros y la identificación de miles de genes cuya función aún se desconoce. En los dos últimos decenios los investigadores desarrollaron la *genética inversa*, que es un proceso para determinar el fenotipo (o sea la función) con base en el conocimiento del genotipo. El enfoque básico de la genética inversa es eliminar la función de un gen específico y luego determinar el efecto de la eliminación en el fenotipo. Primero se considera cómo introducen los investigadores mutaciones específicas en genes in vitro, y luego se exponen dos técnicas ampliamente usadas para eliminar la función génica in vivo.

Mutagénesis in vitro

Como resulta evidente en todo este libro, el aislamiento de mutantes naturales tiene una participación de gran importancia en el descubrimiento de la función de los genes y sus productos. Sin embargo, las mutaciones naturales son fenómenos raros y no es factible usar estas mutaciones para estudiar la participación de residuos de aminoácidos particulares en la función de una proteína determinada. En lugar de esperar a que aparezca un organismo con un fenotipo inusual para identificar la mutación causante, los investigadores pueden mutar el gen (o sus regiones reguladoras relacionadas) en la forma deseada y observar el cambio fenotípico resultante. Estas técnicas, denominadas colectivamente *mutagénesis in vitro*, requieren que el gen (o al menos el segmento génico) por mutar se haya clonado.

Un procedimiento desarrollado por Michael Smith de la *University of British Columbia* se denomina **mutagénesis dirigida a un sitio** (*site-directed mutagenesis*, **SDM**) y permite a los investigadores hacer cambios específicos muy pequeños en una secuencia de DNA, como la sustitución de una base por otra, o la deleción o inserción de una cantidad muy pequeña de bases. Por lo general la SDM inicia con la síntesis de un oligonucleótido de DNA que contiene el cambio deseado, se permite que este oligonucleótido se hibride con un preparado monocatenario de DNA normal, y luego el oligonucleótido se utiliza como iniciador para la polimerasa de DNA. La polimerasa alarga el cebador mediante la adición de nucleótidos complementarios del DNA normal. El DNA modificado puede clonarse entonces y determinar el efecto de la alteración genética introduciendo el DNA en una célula hospedadora adecuada. Los científicos suelen usar SDM para responder a interrogantes muy puntuales acerca de la función de un gen o una proteína. Por ejemplo, podrían cambiar un aminoácido por otro para obtener indicios acerca del cometido de ese sitio específico en el funcionamiento global de una proteína. De manera alternativa, podrían introducir cambios en la región reguladora de un gen y determinar el efecto en la expresión génica. Si el objetivo de la mutagénesis dirigida a un sitio es simplemente suprimir el funcionamiento de un gen, pueden usarse métodos menos específicos. Por ejemplo, si se corta una secuencia génica en un sitio de restricción, se usa polimerasa de DNA para convertir las regiones monocatenarias de los extremos pegajosos en DNA bicatenario y se vuelven a ligar esos extremos, es posible destruir el marco de lectura de una proteína. En otros casos podría eliminarse del gen un fragmento de restricción completo.

Crear una mutación in vitro es sólo un aspecto de la genética inversa. Para estudiar el efecto de una mutación artificial en un fenotipo, es necesario sustituir el gen normal por el alelo mutado en el organismo en cuestión. El desarrollo de una técnica para introducir mutaciones en el genoma murino abrió la puerta para los estudios de genética inversa en mamíferos, y literalmente revolucionó el estudio del funcionamiento génico de este grupo taxonómico.

Ratones con bloqueo génico

En varias partes de este libro se describen los fenotipos de ratones que carecen de una copia funcional de un gen particular. Por ejemplo, se indicó que los ratones que carecen de una copia funcional del gen *p53* siempre desarrollan tumores malignos (pág. 676). Estos animales, llamados **ratones con bloqueo génico**, pueden aportar información única de la base genética de la enfermedad humana, así como un mecanismo para estudiar las diversas actividades celulares en las que el producto de un gen particular pudiera participar. Los ratones con bloqueo génico son resultado de una serie de procedimientos experimentales que se muestran en la figura 18-49.

Mario Capecchi de la *Utah University*, Oliver Smithies de la *Wisconsin University* y Martin Evans de la *Cambridge University* desarrollaron los diversos procedimientos empleados para generar ratones con bloqueo génico en el decenio de 1980. El primer paso es aislar un tipo inusual de célula que tenga poderes ilimitados para poderse diferenciar. Estas células, denominadas **células primordiales embrionarias** (pág. 19), se encuentran en el blastocisto de los mamíferos, que es una etapa temprana del desarrollo embrionario comparable a la etapa de blástula de otros animales. El blastocisto de un mamífero (fig. 18-49) se compone de dos partes distintas. La capa externa constituye el *trofectodermo*, que da origen a la mayoría de las membranas

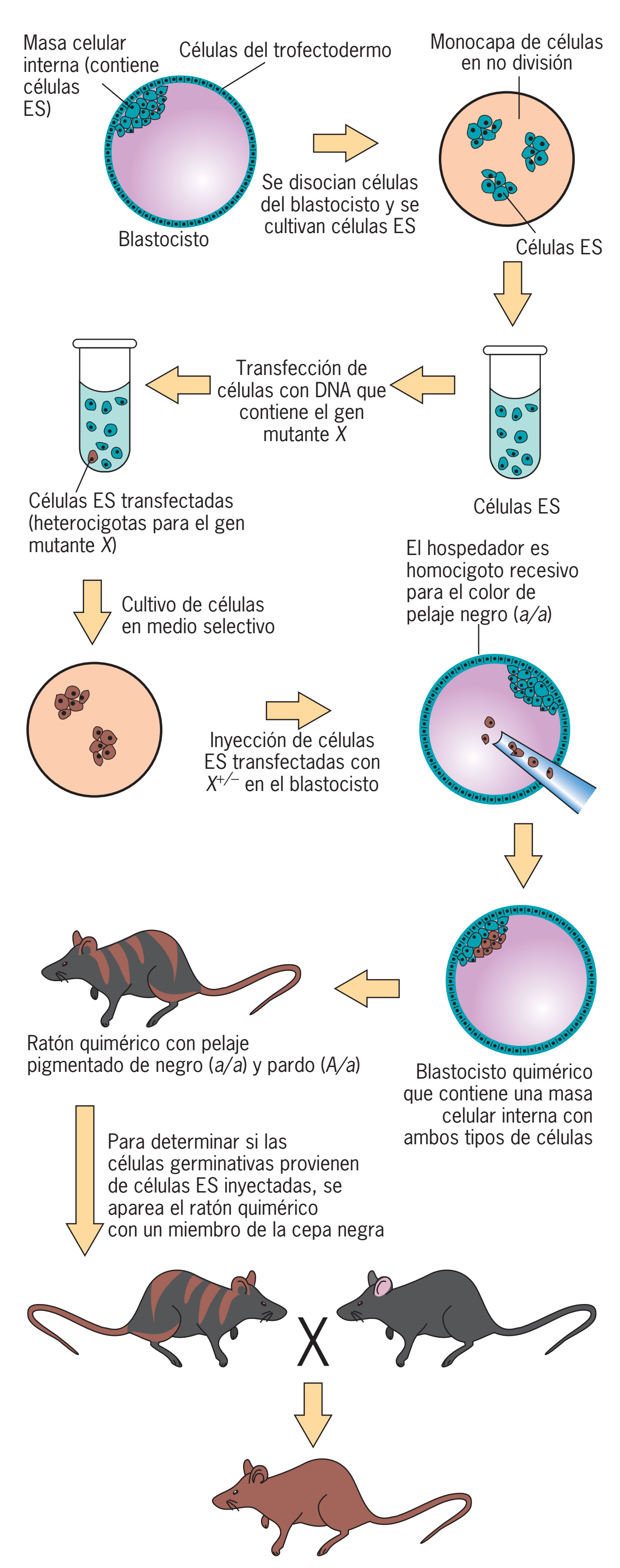


FIGURA 18-49 Formación de ratones con bloqueo génico. Los pasos se describen en el texto.

extraembrionarias características de un embrión de mamífero. La superficie interna del trofectodermo está en contacto con un cúmulo de células llamado *masa celular interna* que se proyecta hacia la cavidad espaciosa (blastocele). La masa celular interna da origen a las células que forman el embrión. La masa celular interna contiene las células primordiales embrionarias, que se diferencian en todos los tejidos diversos de que se compone el mamífero.

Las células primordiales primarias pueden aislarse de blastocistos y cultivarse in vitro bajo condiciones en las que las células crecen y proliferan. Las células primordiales embrionarias se transfectan después con un fragmento de DNA que contenga un alelo mutante no funcional del gen que va a eliminarse, así como genes de resistencia a antibiótico que pueden usarse para seleccionar las células que incorporaron el DNA alterado en su genoma. Alrededor de una de 10^4 células que captan el DNA pasa por un proceso de *recombinación homóloga* en el que el DNA de la transfección suple la secuencia homóloga de DNA. Mediante este procedimiento se producen y seleccionan las células primordiales embrionarias que son heterocigotas para dicho gen con base en su resistencia antibiótica. En el siguiente paso varias de estas células donantes se inyectan en el blastocele de un embrión de ratón receptor. En el protocolo descrito en la figura 18-49, el embrión receptor se obtiene de una cepa negra. El embrión inyectado se implanta en el oviducto de una hembra que se preparó con hormonas para llevar el embrión a término. Mientras el embrión se desarrolla en su madre sustituta, las células primordiales embrionarias inyectadas se unen con la masa celular interna propia del embrión y contribuyen a la formación de tejidos embrionarios, inclusive las células germinales de las gónadas. Estos ratones quiméricos pueden reconocerse porque su pelaje tiene características de las cepas donante y receptora. Los ratones quiméricos se aparean con un miembro de una cepa endogámica negra para saber si las células germinales contienen la mutación de eliminación génica. La descendencia será heterocigota para el gen en todas sus células si las células germinales contienen la mutación por eliminación. Los heterocigotos pueden reconocerse por la coloración parda de su pelaje. Después estos heterocigotos se aparean entre sí para producir descendientes homocigotos para el alelo mutante. Éstos son los ratones con bloqueo génico que carecen de una copia funcional del gen. Cualquier gen del genoma, o cualquier secuencia de DNA para el caso, puede modificarse de cualquier manera que se desee usando este método experimental.

En algunos casos la deleción de un gen particular puede conducir a la ausencia de un proceso particular, lo que proporciona evidencia convincente de que el gen es esencial para ese proceso. Sin embargo, a menudo la deleción de un gen que se cree participa en un proceso esencial causa poca o ninguna alteración en el fenotipo del animal. Estos resultados pueden ser difíciles de interpretar. Por ejemplo, es posible que el gen no participe en el proceso que se estudia o, como casi siempre sucede, que la ausencia del producto del gen se compense con el producto de un gen distinto. La compensación de un gen por otro puede verificarse con la producción de ratones que carecen de los dos genes en cuestión (es decir, doble bloqueo génico).

En otros casos la ausencia de un gen conduce a la muerte del ratón durante las etapas tempranas del desarrollo, lo que también dificulta la identificación de la participación del gen en la función celular (véase un ejemplo en la página 333). Muchas

veces los investigadores pueden resolver este problema con una técnica que permite eliminar un gen particular sólo en uno o más tejidos deseados, mientras que el gen se expresa en el resto del animal. Estas *desactivaciones condicionales*, como se les conoce, suelen permitir que el animal sobreviva hasta la edad adulta y los investigadores pueden estudiar la participación del gen en el desarrollo o la función del tejido afectado.

Interferencia de RNA

Los ratones con bloqueo génico representan una estrategia invaluable para aprender respecto a la función de los genes, pero la generación de estos animales es laboriosa y cara. En los últimos años se utiliza cada vez más una nueva técnica de genética inversa. Como se explica en la página 459, la interferencia del RNA (iRNA) es un proceso en el que un RNA mensajero específico se degrada por la presencia de un pequeño RNA de cadena doble (dsRNA) cuya secuencia está contenida en la secuencia del mRNA. Las funciones de los genes de una planta, nematodo o mosca de la fruta pueden estudiarse con la simple inyección de un RNA de cadena doble en uno de estos organismos para examinar el fenotipo del organismo que se produce con la degradación del mRNA correspondiente. Con esta estrategia puede reunirse información de las funciones de grandes cantidades de genes en un periodo relativamente corto. Como se señala en la página 461, la iRNA puede usarse para estudiar la función de los genes en células de mamíferos si las células se incuban con pequeños RNA de cadena doble o mediante manipulación genética para que las células produzcan RNA de cadena doble. Una vez dentro de la célula, el RNA de cadena doble conduce a la degradación del mRNA blanco, lo que ocasiona que la célula sea incapaz de producir proteína adicional codificada por ese gen. Cualquier deficiencia en el fenotipo de la célula puede atribuirse a una disminución marcada en el nivel de la proteína que se investiga. La figura 18-50, que presenta un ejemplo de esta estrategia, muestra el efecto de la separación de cromosomas después de la transfección de las células con un RNA de cadena doble que se enfoca en la cinasa Aurora B (pág. 594).

También se dispone de bibliotecas (o catálogos) con miles de dsRNA pequeños, o vectores que contienen DNA que codifican estos RNA, para el estudio de las funciones de los genes humanos. Los investigadores que utilizan estas bibliotecas pueden estudiar los efectos sobre cualquier proceso dado que resultan de anular la expresión de virtualmente cualquier gen del genoma. Estos estudios han proporcionado nuevos indicios sobre las funciones desconocidas hasta entonces de numerosos genes.

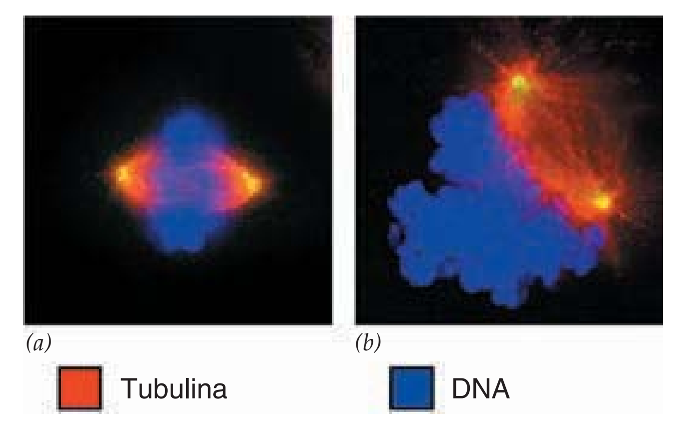


FIGURA 18-50 Identificación de la función génica mediante interferencia con el RNA. *a*) Una célula cultivada de mamífero no tratada en la metafase de la mitosis. *b*) El mismo tipo de célula que se trató con RNA de cadena doble diseñado para inducir la destrucción de los mRNA que codifican la cinasa Aurora B, una proteína que participa en el punto de revisión del huso en la metafase (pág. 592). Los cromosomas de esta célula son adyacentes al huso mitótico, lo que sugiere la ausencia de interacciones entre el cinetocoro y el microtúbulo. (Tomada de Claire Ditchfield, et al., por cortesía de Stephen S. Taylor, J Cell Biol 161:276, 2003; mediante autorización de derechos reservados de la Rockefeller University Press.)

18.19 USO DE ANTICUERPOS

Como se explica en el capítulo 17, los anticuerpos (o inmunoglobulinas) son proteínas que se producen en los tejidos linfoides como respuesta a la presencia de materiales extraños, o antígenos. Una de las propiedades más atractivas de los anticuerpos y que los hace tan útiles para los investigadores en biología es su especificidad notable. Una célula puede contener miles de proteínas diferentes y aun así una preparación de anticuerpos se une sólo con las moléculas seleccionadas dentro de la célula que tienen una pequeña parte que se adapta a los sitios para unión de antígeno de las moléculas de anticuerpo. A menudo pueden obtenerse anticuerpos que distinguen entre dos polipéptidos que sólo difieren en un aminoácido.

Desde hace mucho tiempo los biólogos aprovechan los anticuerpos y desarrollan una gran variedad de técnicas que los utilizan. En general se cuenta con dos estrategias distintas para la preparación de moléculas de anticuerpo que interactúan con un antígeno determinado. En la estrategia tradicional, un animal (por lo general un conejo o una cabra) se inyecta varias veces con el antígeno y tras un periodo de varias semanas se extrae sangre que contiene los anticuerpos deseados. La sangre entera se trata para eliminar las células y los factores de coagulación a fin de producir un **antisuero**, que puede someterse a prueba para cuantificar su título de anticuerpos y del que pueden purificarse las inmunoglobulinas. Aunque este método para producir anticuerpos aún está en uso, tiene ciertas desventajas inherentes. A causa del mecanismo de síntesis de anticuerpos, un animal siempre produce diversas especies de distintas inmunoglobulinas, es decir, inmunoglobulinas con diferentes regiones V en sus cadenas polipeptídicas, aun cuando se enfrentan con una preparación purificada del antígeno. Se dice que un antisuero que contiene varias inmunoglobulinas que se unen con el mismo antígeno es *policlonal*. Como las inmunoglobulinas tienen estructuras demasiado similares para fraccionarse, resulta imposible obtener una preparación de una sola especie purificada de anticuerpo con esta técnica.

En 1975 Cesar Milstein y Georges Köhler del *Medical Research Council* en Cambridge, Inglaterra, realizaron un conjunto trascendental de experimentos que condujo a la preparación de anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos. Para comprender su trabajo es necesario divagar un poco. Dado un

clon determinado de células productoras de anticuerpos (que provienen de un solo linfocito B) se sintetizan anticuerpos con sitios idénticos para combinación con antígenos. La heterogeneidad de los anticuerpos producidos cuando se inyecta un solo antígeno purificado a un animal se debe al hecho de que se activan muchos linfocitos B distintos, cada uno con anticuerpos unidos con la membrana con afinidad por una parte diferente del antígeno. Surgió una pregunta importante: ¿era posible resolver este problema y obtener una sola especie de molécula de anticuerpo? Considérese por un momento los resultados de un procedimiento en el que un animal recibe una inyección de un antígeno purificado, se espera un periodo de varias semanas para que los anticuerpos se produzcan, se extraen el bazo u otros órganos linfoides, se prepara una suspensión de células únicas, se aíslan las células que producen el anticuerpo deseado y esas células particulares se cultivan como colonias separadas para obtener grandes cantidades de esta inmunoglobulina particular. Si se siguiera este procedimiento, se obtendría una preparación de moléculas de anticuerpo producidas por una sola colonia (o clon) de células, que se conoce como **anticuerpo monoclonal**. Sin embargo, como las células productoras del anticuerpo no crecen ni se dividen en cultivo, fue necesario introducir alguna manipulación adicional para obtener anticuerpos monoclonales.

Las células de mieloma maligno son un tipo de célula cancerosa que crece con rapidez en cultivo y produce grandes cantidades de anticuerpos. No obstante, las células de mieloma son poco útiles como herramientas analíticas porque no se forman como respuesta a un antígeno particular. En lugar de eso las células de mieloma se desarrollan a partir de una conversión aleatoria de un linfocito normal al estado maligno y, por tanto, producen el anticuerpo que el linfocito particular sintetizaba antes de volverse maligno.

Milstein y Köhler combinaron las propiedades de estos dos tipos de células: el linfocito normal productor de anticuerpos y la célula de mieloma inmortal. Lograron esta hazaña mediante la fusión de los dos tipos de células para producir células híbridas, denominadas **hibridomas**, que crecen y proliferan de manera indefinida, y también producen grandes cantidades de un solo anticuerpo (monoclonal). El anticuerpo producido es el que el linfocito normal sintetizaba antes de fusionarse con la célula de mieloma.

El procedimiento para la producción de anticuerpos monoclonales se ilustra en la figura 18-51. El antígeno (ya sea en forma soluble o como parte de una célula) se inyecta en el ratón para inducir la proliferación de células específicas formadoras de anticuerpo (paso 1, fig. 18-51). Tras un periodo de varias semanas, el bazo se extrae y se separa en células individuales (paso 2), y los linfocitos productores de anticuerpo se fusionan luego con una población de células de mieloma maligno (paso 3), lo que hace a las células híbridas inmortales, capaces de una división celular ilimitada. Para seleccionar las células híbridas (hibridomas) entre las células no fusionadas se coloca la mezcla celular en un medio en el que sólo puedan sobrevivir los híbridos (paso 4). Después los hibridomas crecen como clones en pozos separados (paso 5) y se revisan en forma individual para detectar la producción de anticuerpo contra el antígeno en estudio. Las células híbridas que contienen el anticuerpo apropiado (paso 6) pueden clonarse in vitro o in vivo (como células tumorales en un animal receptor), de modo que sea posible preparar cantidades ilimitadas del anticuerpo monoclonal. Una vez que los hibridomas se producen, pueden almacenarse por tiempo indefinido

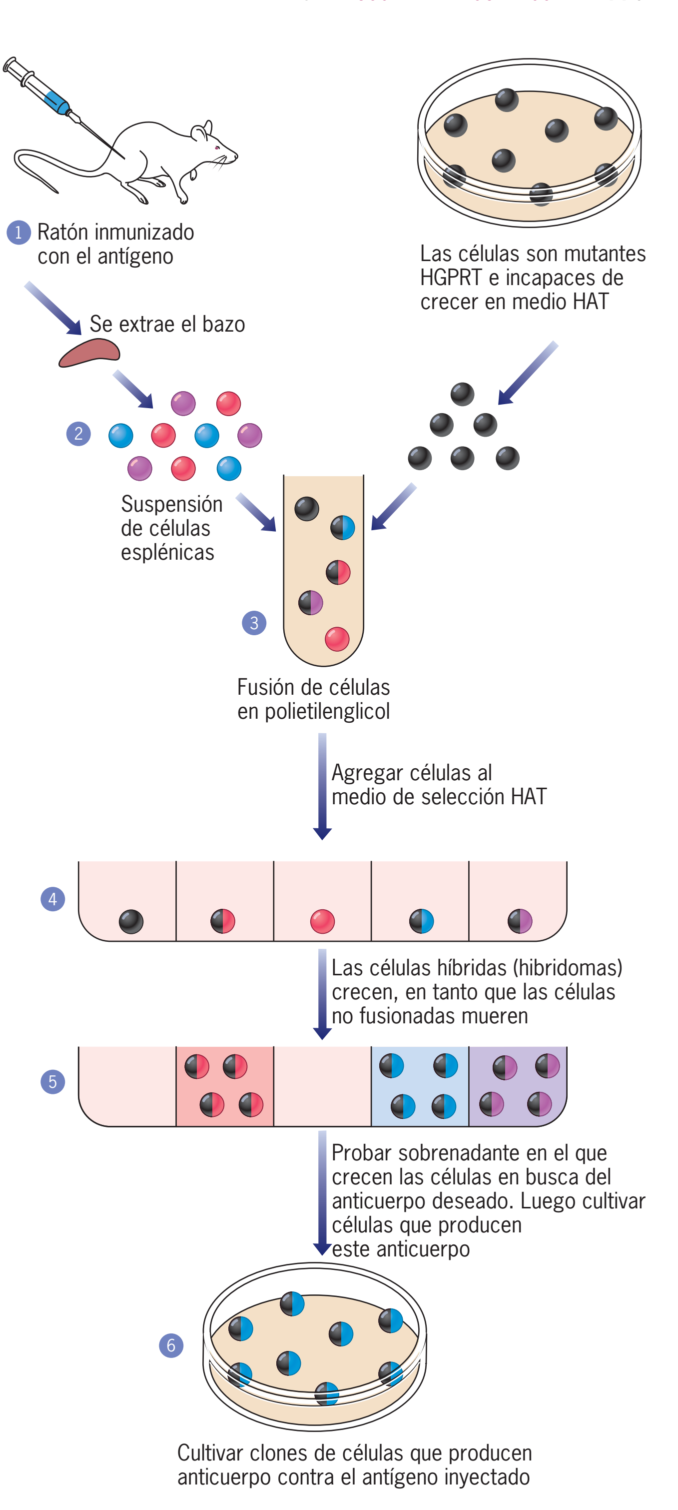


FIGURA 18-51 Formación de anticuerpos monoclonales. Los pasos se describen en el texto. El medio HAT se llama así porque contiene hipoxantina, aminopterina y timidina. Este medio permite el crecimiento de las células con una transferasa fosforribosilo de hipoxantina-guanina (HGPRT), pero no apoya el crecimiento de células que carecen de esta enzima, como las células de mieloma múltiple sin fusionar que se usaron en este procedimiento.

congelados y mantenerse alícuotas disponibles para los investigadores en todo el mundo.

Una de las características más importantes de esta metodología es que no se tiene que comenzar con un antígeno purificado para obtener un anticuerpo. De hecho el antígeno para el que se busca el anticuerpo monoclonal puede ser un componente menor de toda la mezcla. Además de su empleo en la investigación, los anticuerpos monoclonales tienen una participación valiosa en la medicina diagnóstica, en pruebas para determinar la concentración de proteínas específicas en la sangre u orina. En uno de los ejemplos los anticuerpos monoclonales son la base de ciertas pruebas caseras de embarazo que detectan la presencia de una proteína (gonadotropina coriónica) que aparece en la orina unos cuantos días después de la concepción.

Cuando se tiene la preparación de moléculas de anticuerpo, obtenidas ya sea por técnicas inmunológicas convencionales o mediante la formación de hibridomas, estas moléculas pueden usarse como sondas muy específicas en varias técnicas analíticas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden usarse en la purificación de proteínas. Cuando se agrega un anticuerpo purificado a una mezcla cruda de proteínas, la proteína específica que se busca se combina de manera selectiva con el anticuerpo y se precipita de la solución. Los anticuerpos también pueden emplearse en conjunto con varios tipos de procedimientos de fraccionamiento para identificar una proteína particular (antígeno) entre una mezcla de proteínas. Por ejemplo, en una prueba con el *método Western* primero se fracciona una mezcla de proteínas por electroforesis bidimensional (como en la figura 18-29). A continuación las proteínas fraccionadas se transfieren a una hoja de filtro de nitrocelulosa, que se incuba con una preparación de anticuerpos marcados con radiactividad o fluorescencia. La localización en el filtro de la proteína específica unida con el anticuerpo puede establecerse mediante la localización de la radiactividad o la fluorescencia.

Los anticuerpos monoclonales preparados por el método recién descrito no sólo son excelentes herramientas de investigación, también son muy útiles como agentes terapéuticos en los humanos (pág. 683). Los esfuerzos por desarrollar hibridomas humanos que produzcan anticuerpos monoclonales no han tenido éxito hasta ahora. Para salvar este obstáculo, algunos ratones se modificaron por ingeniería genética para que los anticuerpos que producen sean cada vez más humanos en cuanto a la secuencia de aminoácidos. Varios de estos anticuerpos monoclonales humanizados se aprobaron ya para el tratamiento de diversas enfermedades. En fechas recientes los ratones se modificaron para que su sistema inmunitario sea de naturaleza "humana". Estos animales producen anticuerpos con estructura humana por completo.

El primer anticuerpo totalmente humano (adalimimab), aprobado para el tratamiento de la artritis reumatoide (pág. 720), fue producido por una técnica muy distinta en la que se usa bacteriófago en vez de hibridomas como base para la producción de anticuerpo monoclonal. Esta técnica se conoce como *exhibición en fago*. En esta técnica se generan miles de millones de partículas fágicas distintas, cada una de las cuales porta un gen que codifica una molécula de anticuerpo humano que posee una región variable única (pág. 705). Diferentes fagos de esta vasta biblioteca codifican diferentes anticuerpos, esto es, anticuerpos con diferentes regiones variables. En cada caso, el gen para anticuerpo se fusiona con un gen que codifica una de las proteínas de la cubierta vírica, de modo que cuando el fago se ensambla dentro de una célula hospedadora, la molécula de anticuerpo se exhibe en la superficie de la partícula vírica. Supóngase que se tiene una proteína (antígeno) que se piensa podría ser un buen blanco para un anticuerpo terapéutico dado. El antígeno se purifica y se permite que interactúe con una muestra de cada una de las partículas fágicas que constituyen la biblioteca fágica. Aquellos fagos que se unen al antígeno con alta afinidad pueden identificarse, y se les permite que se multipliquen dentro de una célula hospedadora apropiada. Una vez que se ha amplificado de este modo, el DNA que codifica el gen de anticuerpo puede aislarse y usarse para transfectar una célula de mamífero apropiada. Las células modificadas por ingeniería genética pueden entonces multiplicarse en grandes cultivos para producir cantidades terapéuticas del anticuerpo. La producción de anticuerpos en células de mamífero cultivadas es una empresa costosa, y se está intentando con la alternativa de las "fábricas vivas". Entre las posibilidades para esta finalidad se encuentran cabras, conejos y células de la planta del tabaco.

Una rápida revisión de esta obra revela muchas micrografías que muestran la localización inmunitaria de una proteína particular dentro de una célula tal como se ve en el microscopio óptico o el electrónico. La localización inmunitaria de proteínas dentro de una célula depende del uso de anticuerpos que se prepararon de manera específica contra esa proteína particular. Una vez preparadas, las moléculas de anticuerpo se unen (conjugan) con una sustancia que las hace visibles al microscopio, pero no interfiere con la especificidad de sus interacciones. Para utilizarlos con el microscopio óptico, los anticuerpos suelen unirse en complejos con pequeñas moléculas fluorescentes, como la fluoresceína o la rodamina, para formar derivados que luego se incuban con las células o cortes de células. Los sitios de unión se visualizan con el microscopio de fluorescencia. Esta técnica se denomina **inmunofluorescencia directa**. A menudo es preferible realizar la localización de antígenos con una variación de esta técnica llamada **inmunofluorescencia indirecta**. En ésta, las células se incuban con un anticuerpo *no marcado* y se permite que formen complejos con el antígeno correspondiente. La localización de la pareja antígeno-anticuerpo se revela en un segundo paso con una preparación de anticuerpos con marca fluorescente cuyos sitios de combinación están dirigidos contra las moléculas de *anticuerpos* empleadas en el primer paso. La inmunofluorescencia indirecta produce una imagen más brillante porque muchas moléculas del anticuerpo secundario pueden unirse con un solo anticuerpo primario. La inmunofluorescencia indirecta también tiene una ventaja práctica: el anticuerpo conjugado (fluorescente) es fácil de obtener en el mercado. La inmunofluorescencia brinda una claridad notable porque las proteínas unidas con el anticuerpo se revelan a la vista; todos los materiales no marcados permanecen invisibles. La localización de los antígenos con el microscopio electrónico se logra con anticuerpos que se marcaron con materiales electrodensos, como la proteína con hierro ferritina o partículas de oro. La figura 8-23*c*, *d* muestra un ejemplo de esta técnica.

APÉNDICE
Premios Nobel otorgados por investigación en biología celular y molecular desde 1958

Año	*Premiado**	*Premio*	*Área de investigación*	*Páginas en el texto*
2006	Andrew Z. Fire Craig C. Mello	M y F**	Interferencia de RNA	459, 774
	Roger D. Kornberg	Química	Transcripción en eucariotas	437, 492
2004	Richard Axel Linda B. Buck	M y F	Receptores olfatorios	633
	Aaron Ciechanover Avram Hershko Irwin Rose	Química	Ubicuitina y proteasomas	537
2003	Peter Agre Roderick MacKinnon	Química	Estructura de los canales de la membrana	150, 152
2002	Sydney Brenner John Sulston	M y F	Introducción de *C. elegans* como un microorganismo modelo	17
	H. Robert Horvitz		Apoptosis en *C. elegans*	654
	John B. Fenn	Química	Ionización con electrospray en MS	751
	Koichi Tanaka		MALDI en MS	751
	Kurt Wüthrich		Análisis de proteínas con NMR	57
2001	Leland H. Hartwell Tim Hunt Paul Nurse	M y F	Control del ciclo celular	574, 610
2000	Arvid Carlsson Paul Greengard Eric Kandel	M y F	Transmisión sináptica y transducción de señal	168 616
1999	Günter Blobel	M y F	Tránsito de proteínas	285
1998	Robert Furchgott Louis Ignarro Ferid Murad	M y F	ON como mensajero intercelular	652
1997	Jens C. Skou	Química	Na^+/K^+-ATPasa	157
	Paul Boyer John Walker		Mecanismo de la síntesis de ATP	202
	Stanley B. Prusiner	M y F	Estructura proteínica de los priones	65
1996	Rolf M. Zinkernagel Peter C. Doherty	M y F	Reconocimiento de células infectadas con virus por el sistema inmunitario	720
1995	Edward B. Lewis Christiane Nüsslein-Volhard Eric Wieschaus	M y F	Control genético del desarrollo embrionario	VE12
1994	Alfred Gilman Martin Rodbell	M y F	Estructura y función de las proteínas (G) de unión del GTP	622
1993	Kary Mullis	Química	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	763
	Michael Smith		Mutagénesis dirigida a sitio (MDS)	772
	Richard J. Roberts Phillip A. Sharp	M y F	Secuencias intermedias	448

Año	*Premiado**	*Premio*	*Área de investigación*	*Páginas en el texto*
1992	Edmond Fischer Edwin Krebs	M y F	Alteración de la actividad enzimática por fosforilación/desfosforilación	114, 625
1991	Erwin Neher Bert Sakmann	M y F	Medición del flujo de iones mediante registro placa-pinza	151
1989	J. Michael Bishop Harold Varmus	M y F	Genes celulares capaces de causar transformación maligna	688
	Thomas R. Cech Sidney Altman	Química	Capacidad del RNA para catalizar reacciones	478
1988	Johann Deisenhofer Robert Huber Hartmut Michel	Química	Centro bacteriano de reacción de fotosíntesis	221
1987	Susumu Tonegawa	M y F	Reordenamientos del DNA que originan la diversidad de anticuerpos	707
1986	Rita Levi-Montalcini Stanley Cohen	M y F	Factores que afectan el brote neural	381
1985	Michael S. Brown Joseph L. Goldstein	M y F	Regulación del metabolismo del colesterol y la endocitosis	322
1984	Georges Köhler Cesar Milstein	M y F	Anticuerpos monoclonales	775
	Niels K. Jerne		Formación de anticuerpos	698
	Bruce Merrifield	Química	Síntesis química de péptidos	758
1983	Barbara McClintock	M y F	Elementos móviles en el genoma	411
1982	Aaron Klug	Química	Estructura de complejos de ácido nucleico-proteína	77
1980	Paul Berg	Química	Tecnología de DNA recombinante	760
	Walter Gilbert Frederick Sanger		Tecnología de secuenciación de DNA	766
	Baruj Bennacerraf Jean Dausset George D. Snell	M y F	Complejo mayor de histocompatibilidad	709
1978	Werner Arber Daniel Nathans Hamilton Smith	M y F	Tecnología de restricción de endonucleasa	758
	Peter Mitchell	Química	Mecanismo quimioosmótico de fosforilación oxidativa	187
1976	D. Carleton Gajdusek	M y F	Enfermedades basadas en priones	65
1975	David Baltimore Renato Dulbecco Howard M. Temin	M y F	Transcriptasa inversa y actividad vírica tumoral	687
1974	Albert Claude Christian de Duve George E. Palade	M y F	Estructura y función de componentes internos de las células	277, 279
1972	Gerald Edelman Rodney R. Porter	M y F	Estructura de la inmunoglobulina	703
	Christian B. Anfinsen	Química	Relación entre la estructura primaria y terciaria de las proteínas	63
1971	Earl W. Sutherland	M y F	Mecanismo de acción de las hormonas y AMP cíclico	625

Año	*Premiado**	*Premio*	*Área de investigación*	*Páginas en el texto*
1970	Bernard Katz Ulf S. von Euler	M y F	Propagación y transmisión del impulso nervioso	165
	Luis F. Leloir	Química	Función de nucleótidos azúcar en la síntesis de carbohidratos	290
1969	Max Delbrück Alfred D. Hershey Salvador E. Luria	M y F	Estructura genética de los virus	21, 424
1968	H. Gobind Khorana Marshall W. Nirenberg	M y F	Código genético	465
	Robert W. Holley		Estructura del RNA transfer	467
1966	Peyton Rous	M y F	Tumores víricos	686
1965	Francois Jacob Andre M. Lwoff Jacques L. Monod	M y F	Operones bacterianos y RNA mensajero	431, 510
1964	Dorothy C. Hodgkin	Química	Estructura de moléculas orgánicas complejas	752
1963	John C. Eccles Alan L. Hodgkin Andrew F. Huxley	M y F	Bases iónicas de los potenciales de membrana de los nervios	164
1962	Francis H. C. Crick James D. Watson Maurice H. F. Wilkins	M y F	Estructura tridimensional del DNA	395
	John C. Kendrew Max F. Perutz	Química	Estructura tridimensional de proteínas globulares	57
1961	Melvin Calvin	Química	Bioquímica de la asimilación de CO_2 durante la fotosíntesis	229
1960	F. MacFarlane Burnet Peter B. Medawar	M y F	Teoría de selección clonal de la formación de anticuerpos	698
1959	Arthur Kornberg Severo Ochoa	M y F	Síntesis de DNA y RNA	547, 465
1958	George W. Beadle Joshua Lederberg Edward L. Tatum	M y F	Expresión génica	430
	Frederick Sanger	Química	Estructura primaria de las proteínas	55

*En algunos casos se omitieron de esta lista los copremiados cuya investigación se llevó a cabo en un área ajena a la biología celular y molecular.
**M y F: Medicina y fisiología; VE: Vías experimentales.

Temas de interés humano

Nota: La *f* después de un número de página indica figura; la *c* denota un cuadro; *np* se refiere a una nota al pie de página; *PH* alude a un recuadro Perspectiva humana; *VE* hace referencia a un recuadro Vías experimentales.

Glosario

En esta sección se definen muchos términos y conceptos clave. Los números que figuran entre paréntesis después de la mayoría de las definiciones se refieren al capítulo y la sección en los cuales se define el término por primera vez. Por ejemplo, un concepto seguido de (3.2) se define primero en el capítulo 3, sección 2: "Enzimas". Las palabras definidas en las secciones *Perspectiva humana* o *Vías experimentales* aparecen con las letras PH o VE entre paréntesis. Así, un término seguido por (VE1) se define primero en *Vías experimentales* del capítulo 1.

Aceites: grasas que son líquidas a temperatura ambiente. (2.5)

Aceptor primario de electrones: molécula que recibe los electrones fotoexcitados de los pigmentos del centro de reacción en los dos fotosistemas. (6.4)

Acetil-CoA: intermediario metabólico generado a través del catabolismo de muchos compuestos, incluidos los ácidos grasos, y utilizado como sustrato inicial para la vía respiratoria central, el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). (5.2)

Acetiltransferasas de histonas (HAT): enzimas que transfieren grupos acetilo a residuos lisina y arginina de histonas centrales. La acetilación de histonas se vincula con la activación de la transcripción. (12.2, 12.4)

Ácido: molécula que es capaz de donar un ion hidrógeno. (2.3)

Ácido conjugado: forma pareada creada cuando una base acepta un protón en una reacción acidobásica. (2.3)

Ácido desoxirribonucleico (DNA): ácido nucleico bicatenario formado por dos cadenas poliméricas de nucleótidos que contienen desoxirribosa. El DNA (2.5), que es el material genético de todos los organismos celulares, puede experimentar la **duplicación de DNA** (13) y producirse en grandes cantidades de un segmento específico, como en la **clonación de DNA** (18.12). El DNA también puede reunirse en poblaciones de fragmentos que representan la totalidad del genoma de un organismo, como en una **genoteca de DNA**. (18.3)

Ácido ribonucleico (RNA): ácido nucleico monocatenario formado por una cadena polimérica de nucleótidos que contienen ribosa. (2.5)

Ácidos grasos: hidrocarburos largos sin ramificaciones con un grupo de ácido carboxílico en un extremo. (2.5)

Ácidos grasos no saturados: aquellos que tienen uno o más enlaces dobles entre los átomos de carbono. (2.5)

Ácidos grasos saturados: aquellos que tienen sólo enlaces sencillos entre los carbonos. (2.5)

Ácidos nucleicos: polímeros compuestos de nucleótidos, que en los organismos vivos se basan en uno de dos azúcares (ribosa o desoxirribosa), lo que da lugar a los términos ácido ribonucleico (RNA) y ácido desoxirribonucleico (DNA). (2.5)

Acoplamiento excitación-contracción: los pasos que vinculan la recepción de un impulso nervioso, en la membrana plasmática muscular, con el acortamiento de las sarcómeras dentro de la fibra muscular. (9.6)

Actina: proteína estructural globular que se polimeriza para formar filamentos helicoidales flexibles capaces de interactuar con miosina. Los filamentos de actina dan soporte mecánico a las células eucariotas, determinan la forma de la célula y permiten los movimientos celulares. (9.5)

Actividad específica: relación de la cantidad de una proteína de interés respecto de la cantidad total de proteína presente en una muestra; se emplea como medida de purificación. (18.7)

Adaptadores: complejos de proteínas que cubren la cara citosólica de las membranas vesiculares de clatrina de la membrana plasmática y la red *trans* del aparato de Golgi. (8.4)

Adhesiones focales (contactos focales): estructuras adhesivas características de las células en cultivo que se pegan a la superficie de una caja de cultivo. La membrana plasmática en la región de la adhesión focal contiene agrupaciones de integrinas que conectan la matriz extracelular que cubre la caja de cultivo con el sistema de microfilamentos que posee actina del citoesqueleto. (7.2)

Aerobios: organismos que dependen de la presencia de oxígeno para utilizar compuestos ricos en energía. (5.1)

Agente oxidante: sustancia en una reacción redox que se reduce y da lugar a que otra se oxide. (3.3)

Agentes reductores: sustancias de una reacción redox que se oxidan, lo que da lugar a que otras sustancias se reduzcan. (3.3)

Aisladores: secuencias limítrofe especializadas que "cercan" un promotor y su intensificador respecto de otros elementos promotor-intensificador. Según un modelo, las secuencias aisladoras se unen a proteínas de la matriz nuclear. (12.4)

Ajuste inducido: cambio de conformación en una enzima después de que el sustrato se ha unido; permite que la reacción química proceda. (3.2)

Alelos: formas alternativas de un mismo gen. (10.1)

Almidón: mezcla de dos polímeros de glucosa, amilosa y amilopectina, que sirven como energía química disponible en la mayoría de las células de plantas. (2.5)

Aminoácidos: unidades monoméricas de proteínas, cada una compuesta por tres grupos funcionales unidos a una región central, un carbono: un grupo amino, una cadena lateral definida y un grupo carboxilo. (2.5)

Amortiguadores: compuestos que pueden interactuar con el hidrógeno libre o los iones hidroxilo y minimizar el cambio del pH. (2.3)

Anaerobios: organismos que utilizan compuestos ricos en energía a través de una vía metabólica independiente del oxígeno, como la glucólisis y la fermentación. (5.1)

Anafase: el estado de la mitosis durante el cual las cromátides hijas se separan entre sí. (14.2)

Anafase A: el movimiento de los cromosomas hacia los polos durante la mitosis. (14.2)

Anafase B: elongación del huso mitótico que lleva a la separación de los dos polos. (14.2)

Análisis de composición de base: determinación de la cantidad relativa de cada base en muestras de DNA. (10.3)

Aneuploidia: estado en el que una célula tiene un número anormal de cromosomas. (16.1)

Anfipático: importante propiedad biológica por la cual las moléculas poseen regiones hidrófobas e hidrófilas. (2.5, 4.3)

Anfotérica: propiedad estructural que permite a la misma molécula actuar como ácido o base. (2.3)

Angiogénesis: formación de vasos sanguíneos nuevos. (16.4)

Angstrom: unidad métrica equivalente a 0.1 nm; aún se utiliza para medir las dimensiones atómicas y moleculares. (1.3)

Animales transgénicos: aquellos animales manipulados por medios genéticos para que su cromosoma contenga genes ajenos. (18.13)

Anión: átomo o molécula ionizado con una carga neta negativa. (2.1)
Antena: molécula que capta la luz de una unidad fotosintética y atrapa fotones de diferentes longitudes de onda; transfiere la energía de excitación a una molécula de pigmento en el centro de la reacción. (6.4)
Anticodón: una secuencia trinucleotídica en cada tRNA que funciona en el reconocimiento del codón del mRNA complementario. (11.7)
Anticuerpo: una proteína globular inmunoglobulina generada por células plasmáticas, a su vez derivadas de los linfocitos B que interactúan con la superficie de algún agente patógeno o sustancia extraña para facilitar su destrucción. (17.4)
Anticuerpos monoclonales: preparación de moléculas de anticuerpos producida a partir de una sola colonia (o clon) de células. (18.19)
Antígeno: sustancia que el sistema inmunitario reconoce como extraña al organismo. (17.2)
Antisuero: secreción que contiene los anticuerpos deseados que permanecen después de la eliminación de las células y factores de coagulación de la sangre completa expuesta a un antígeno. (18.19)
Aparato de Golgi: es una red de membranas lisas organizadas en una morfología característica e incluye cisternas semejantes a discos aplanados, con extremos dilatados, vesículas y túbulos. El aparato de Golgi funciona de manera primaria como una planta de procesamiento en la cual las proteínas sintetizadas de nueva cuenta en el retículo endoplásmico se modifican por medio de vías específicas. (8.4)
Apoptosis: un tipo de muerte celular (programada) en el cual la célula responde a ciertas señales al iniciar una reacción normal que lleva a la muerte de ella misma. La muerte por apoptosis se caracteriza por la compactación de la célula y su núcleo, la disección ordenada de la cromatina en piezas debido a la acción de una endonucleasa específica que actúa sobre el DNA y luego una rápida fagocitosis de las células. (15.8)
Artefacto: imagen observada en un microscopio como resultado de la coagulación o precipitación de materiales que no forman parte de la célula viva. (18.2)
Áster: ordenamiento en “resplandor solar” de los microtúbulos que rodean a cada centrosoma durante la profase. (14.2)
Átomo electronegativo: átomo con la mayor fuerza de atracción; el átomo que captura la mayoría de los electrones de un enlace covalente. (2.1)
Átomos de cobre de la cadena de transporte de electrones: tipo de portador de electrones; esos átomos se localizan dentro de un mismo complejo proteínico de la membrana mitocondrial interna que acepta y dona un solo electrón al tiempo que aquéllos alternan entre los estados Cu^{2+} y Cu^{1+}. (5.3)
Aumentador: sitio regulador del DNA que puede localizarse a considerable distancia, sea corriente arriba o corriente abajo del promotor regulador. La unión de uno o más factores transcripcionales a la secuencia aumentadora llega a incrementar en grado notable la velocidad de la transcripción de un gen. (12.4)
Autoanticuerpos: moléculas capaces de reaccionar con los tejidos del propio organismo. (PH17)
Autoensamble: propiedad de las proteínas (u otras estructuras) para asumir las conformaciones correctas con base en el comportamiento químico dictado por la secuencia aminoacídica. (2.5)
Autofagia: destrucción de organelos y su remplazo durante la cual un organelo se rodea de una membrana que proviene del retículo endoplásmico. La membrana que rodea al organelo se fusiona entonces con un lisosoma. (8.6)
Autorradiografía: técnica para visualizar procesos bioquímicos y permitir a un investigador determinar la localización de materiales marcados con radiactividad dentro de la célula. Las secciones de tejido contienen isótopos radiactivos y a éstos los recubre una emulsión fotográfica muy delgada, la cual se expone a la radiación que emana del tejido. Los sitios en las células que contienen radiactividad se revelan bajo el microscopio como gránulos de plata después del revelado de la emulsión. (8.2, 18.4)
Autótrofo: organismo capaz de sobrevivir en CO_2 como principal fuente de carbono. (6.9)
Axón: prolongación conspicua individual del cuerpo celular que conduce impulsos desde éste hacia la célula o las células blanco. (4.8)
Axonema: núcleo central que contiene microtúbulos de un cilio o flagelo. La mayoría de los axonemas poseen nueve dobletes periféricos, dos microtúbulos centrales y numerosas estructuras accesorias. (9.3)

Bacteriófagos: un grupo de virus que requieren bacterias como hospedador. (1.4)
Balsas lipídicas: microdominios dentro de una membrana celular que poseen menor fluidez debido a la presencia de colesterol, glucolípidos y fosfolípidos que contienen ácidos grasos saturados de cadena más larga. Ubicación propuesta de las proteínas ancladas a GPI. (4.5)
Barrera con permeabilidad selectiva: cualquier estructura, como la membrana plasmática, que permite a algunas sustancias pasar con libertad e impide el paso de otras. (4.1)
Base: cualquier molécula capaz de aceptar un ion hidrógeno. (2.3)
Base conjugada: forma pareada creada cuando un ácido pierde un protón en una reacción acidobásica. (2.3)
Bicapa lipídica: formada por aquellos fosfolípidos autoensamblados en una estructura bimolecular basada en interacciones hidrófobas e hidrófilas; tiene importancia biológica como núcleo de la organización de las membranas celulares. (4.2)
Bioenergética: estudio de los diferentes tipos de transformación de energía que ocurren en los organismos vivos. (3.1)
Bivalente (tétrada): complejos formados durante la meiosis por un par de cromosomas homólogos en sinapsis. (14.3)
Bloqueo génico: bloqueo obtenido como resultado de procedimientos experimentales, en los cuales se pierde un gen funcional que en condiciones normales debería tener. (18.18)
Bomba de sodio-potasio (ATPasa de Na^+/K^+): proteína de transporte que utiliza ATP como fuente de energía para transportar iones de sodio y potasio; el resultado es que cada cambio conformacional transporta tres iones de sodio fuera de la célula y dos iones de potasio hacia dentro de ella. (4.7)
Cadena adelantada: cadena de DNA hija resintetizada de manera continua; se conoce así debido a que su síntesis es continua, como parte de los avances de la horquilla de replicación. (13.1)
Cadena beta (β): estructura secundaria de un polipéptido en la cual el esqueleto de la cadena adopta un plegamiento conformacional. (2.5)
Cadena lateral: el grupo principal que define la función de un aminoácido; puede extenderse desde un solo hidrógeno hasta unidades complejas polares o apolares en los 20 aminoácidos encontrados con más frecuencia en las células. (2.5)
Cadena ligera: la más pequeña de los dos tipos de cadenas polipeptídicas de un anticuerpo; tiene una masa molecular de 23 kDa. (17.4)
Cadena polipeptídica: polímero largo continuo formado por la unión de aminoácidos uno tras otro mediante enlaces peptídicos covalentes. (2.5)
Cadena retrasada: cadena del DNA hija resintetizada de manera discontinua; se llama así porque el inicio de cada fragmento debe esperar a que las cadenas parentales se separen y expongan moldes adicionales. (13.1)
Cadenas pesadas: uno de los dos tipos de cadenas polipeptídicas de un anticuerpo, por lo general con una masa molecular de 50 a 70 kDa. (17.4)

Cadena de transporte de electrones o cadena respiratoria: acarreadores de electrones embebidos en la membrana que aceptan electrones de alta energía y disminuyen de manera secuencial el estado energético de los electrones a medida que migran a través de la cadena; el resultado neto es la captura de energía para su utilización en la síntesis de ATP u otras moléculas que almacenan energía. (5.3)

Caderinas: familia de glucoproteínas relacionadas que median la adhesión celular dependiente de Ca^{2+}. (7.3)

Calmodulina: proteína pequeña, que sirve de unión al calcio sumamente distribuida; cada molécula de calmodulina contiene cuatro sitios de unión para calcio. (15.5)

Cambio conformacional: movimiento predecible dentro de una proteína que se relaciona con su actividad biológica. (2.5)

Cambio de energía libre (ΔG): cambio ocurrido durante un proceso en la cantidad de energía disponible para efectuar trabajo. (3.1)

Cambio de entalpía (ΔH): cambio observado durante un proceso en el contenido de energía total de un sistema. (3.1)

Canal controlado: canal iónico que puede cambiar de conformación entre una forma abierta a su ion soluto y otra cerrada a éste; dichos canales pueden ser controlados por voltaje o por ligando, dependiendo de la naturaleza del proceso que induce el cambio de conformación. (4.7)

Canal iónico: estructura transmembranosa (p. ej., una proteína integral con un poro acuoso) permeable a un ion específico o diferentes iones. (4.7)

Carabinas moleculares: diversas familias de proteínas con la función de ayudar al ensamblaje de proteínas al impedir interacciones indeseables. (VE2)

Carbohidratos: moléculas orgánicas que incluyen azúcares simples (sacáridos) y polímeros de polisacáridos que sirven como almacén de energía y componentes estructurales de la célula. (2.5)

Cariotipo: imagen en la cual los cromosomas homólogos pareados se ordenan de acuerdo con su tamaño en forma decreciente. (12.1)

Cascada de Ras-cinasa de MAP: cascada que se activa en respuesta a una amplia variedad de señales extracelulares y que tiene un cometido clave en la regulación de actividades vitales como la proliferación celular y la diferenciación. (15.4)

Caspasas: familia de proteasas de cisteína que se activan en una etapa temprana de la apoptosis y se encargan de los sucesos de degradación observados durante la muerte celular. (15.8)

Casquete de metilguanosina: modificación del 5′ terminal de un precursor de la molécula de mRNA, de tal modo que la guanosina terminal “invertida” se metila en la posición 7′ en la base de guanina, mientras que el nucleótido en el lado interno del puente de trifosfato lo hace en la posición 2′ de la ribosa. Este casquete previene que las nucleasas digieran el extremo 5′ del mRNA, ayuda en el transporte del mRNA fuera del núcleo y tiene una función importante en el inicio de la traducción del mRNA. (11.4)

Catión: átomo o molécula ionizado con una carga neta positiva. (2.1)

Célula asesina natural: tipo de linfocito que realiza un ataque inespecífico a una célula hospedadora infectada y genera la apoptosis. (17.1)

Células madre hematopoyéticas (HSC): células localizadas principalmente en la médula ósea, capaces de autorrenovarse y de dar origen a todos los tipos de células sanguíneas. (PH1, 17.1)

Células madre: células situadas en diferentes tejidos del organismo que constituyen una población de reserva capaz de dar lugar a diferentes células en ese tejido. Las células madre pueden definirse como células indiferenciadas, que son capaces de: 1) autorrenovarse, es decir, producen células semejantes a estas células madre, y 2) diferenciarse en dos o más tipos celulares maduros. (PH1)

Células plasmáticas: células diferenciadas que se desarrollan a partir de linfocitos B que sintetizan y secretan gran cantidad de anticuerpos sanguíneos. (17.2)

Células presentadoras de antígeno (APC): células que presentan porciones de proteína antigénica en su superficie. Los fragmentos derivan de la proteólisis de antígenos mucho más grandes. Los péptidos antigénicos se presentan en conjunto con las moléculas del CMH. Cualquier célula en el cuerpo puede funcionar como una APC al presentar los péptidos en combinación con las moléculas de clase I del CMH, que proveen un mecanismo para la destrucción de las células infectadas. En contraste, los macrófagos, las células dendríticas y las células B se conocen como APC “profesionales” debido a que funcionan al ingerir materiales, procesarlos y presentarlos a las células T colaboradoras en combinación con las moléculas de clase II del CMH. (17.4)

Células procariotas: células bacterianas simples, desde el punto de vista estructural, que no tienen organelos limitados por membranas; procede del griego *pro-karyon*, esto es, “antes del núcleo”. (1.3)

Células somáticas: todas aquellas células del cuerpo, con excepción de las células de la línea germinal (p. ej., aquellas que pueden originar a los gametos).

Celulosa: polímero de glucosa no ramificada con enlaces β $(1 \rightarrow 4)$ que tienden a agregarse en una formación semejante a cables; sirve como el elemento estructural principal de las paredes celulares de los vegetales. (2.5)

Centrifugación diferencial: técnica usada para aislar en gran cantidad un organelo en particular, basada en el principio según el cual mientras sean más densas que el medio circundante, las partículas de diferente tamaño y forma viajan hacia la parte inferior del tubo de la centrífuga a distintas velocidades cuando se colocan en un campo de centrifugación. (18.6)

Centriolos: estructuras cilíndricas de unos 0.2 μm de ancho y dos veces más de largo que contienen nueve fibrillas espaciadas; cada una de éstas aparece en una parte seccionada como una banda de tres microtúbulos. Los centriolos siempre se encuentran en pares y los miembros se hallan en ángulos rectos el uno respecto del otro. (9.3)

Centro de reacción de la clorofila: la molécula única de clorofila de varios cientos de unidades fotosintéticas que es capaz de transferir electrones a un aceptor de éstos. (6.4)

Centrómero: indentación marcada en un cromosoma mitótico que sirve como el sitio de la formación del cinetocoro. (12.1)

Centros organizadores de microtúbulos: variedad de estructuras especializadas que, en virtud de su función en el inicio de la formación de microtúbulos, se conocen como centros organizadores de microtúbulos. (9.3)

Centrosoma: estructura compleja que contiene dos centriolos en forma de barras rodeadas por **material pericentriolar** electrodenso y amorfo donde están centrados los microtúbulos. (9.3)

Chaperonas: proteínas que se unen a otros polipéptidos, previenen su agregación y promueven su ensamble o plegamiento en proteínas multiméricas. (VE2)

Chaperoninas: miembros de las chaperonas de la clase Hsp60, por ejemplo, GroEL, que forman complejos cilíndricos de 14 subunidades dentro de los cuales se realiza el plegamiento de los polipéptidos. (VE2)

Cianobacterias: en términos evolutivos, procariotas importantes y complejos a nivel estructural que poseen membranas fotosintéticas citoplásmicas. (1.3)

Ciclo celular: estado a través del cual una célula pasa de una división celular a otra. (14.1)

Ciclo de Calvin (o ciclo de Calvin-Benson): vía para la conversión de CO_2 en carbohidrato; ocurre en cianobacterias y en todas las células fotosintéticas eucariotas. (6.6)

Ciclo del ácido tricarboxílico: la vía metabólica circular que oxida la acetil-

CoA, con conservación de su energía; el ciclo también se conoce como ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico. (5.2)
Cilio primario: un solo cilio no móvil (presente en muchos tipos celulares en vertebrados) que al parecer tiene una función sensorial. (PH9)
Cilios: organelos móviles parecidos a pelos que se proyectan desde la superficie de diversas células eucarióticas. Los cilios tienden a existir en grandes cantidades en la superficie de una célula. (9.3)
Cinasa de proteína: enzima que transfiere grupos fosfato a otras proteínas, a menudo con el efecto de regular la actividad de la otra proteína. (3.3)
Cinasas dependientes de ciclinas (Cdk)**:** enzimas que controlan el avance de las células a través del ciclo celular. (14.1)
Cinesina: proteína motora grande que crece hacia el extremo que mueve las vesículas membranosas y otros organelos a lo largo de los microtúbulos en el citoplasma. La cinesina es un miembro de la familia de las **proteínas semejantes a cinesina**. (9.3)
Cinetocoro: estructura semejante a un plato situada en la superficie externa del centrómero a la que se unen los microtúbulos del asa cromática. (14.2)
Cisterna *medial*: cisterna del aparato de Golgi entre las cisternas *cis* y *trans*. (8.4)
Cisterna *trans*: la cisterna del aparato de Golgi más alejada del retículo endoplásmico. (8.4)
Cisternas *cis*: cisternas del aparato de Golgi muy cercanas al retículo endoplásmico. (8.4)
Citocinas: proteínas secretadas por las células del sistema inmunitario que modifican el comportamiento de otras células del mismo sistema. (17.3)
Citocinesis: parte del ciclo celular durante el cual la división física de la célula genera dos células hijas. (14.2)
Citocromos: tipo de acarreadores de electrones en el cual una proteína se une al grupo hem. (5.3)
Citoesqueleto: red interactiva y elaborada compuesta por tres estructuras filamentosas bien definidas: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios. Estos elementos funcionan como a) apoyo estructural; b) una red interna encargada de la posición de diferentes organelos en el interior de la célula; c) parte de una maquinaria requerida para el movimiento de materiales y organelos dentro de las células; d) elementos que generan fuerza para el movimiento de las células de un lugar a otro; e) sitios de fijación de RNA mensajeros y facilitación de su traducción a polipéptidos, y f) transductores de señales para transmitir información de la membrana celular al interior de la célula. (9)
Citosol: región de contenido líquido del citoplasma fuera de los organelos membranosos de una célula eucariota. (1.3)
Clorofila: es el pigmento fotosintético más importante que absorbe la luz. (6.3)
Cloroplasto: organelo citoplásmico especializado que va unido a la membrana y que es el sitio principal de la fotosíntesis en las células eucariotas. (6.1)
Coactivadores: intermediarios que ayudan a los factores de transcripción fijos a estimular el inicio de la transcripción en el promotor central. (12.4)
Código de histona: concepto según el cual el estado y la actividad de una región en particular de la cromatina dependen de las modificaciones covalentes y específicas o combinación de modificaciones de las colas de histonas del nucleosoma en esta región. Las modificaciones se crean por acción de enzimas que acetilan, metilan y fosforilan diferentes aminoácidos dentro de los núcleos de histona. (12.1)
Código genético: forma en que las secuencias nucleotídicas del DNA codifican la información para elaborar un producto proteico. (11.6)
Codón de inicio: triplete AUG, el sitio en el cual el ribosoma se une al mRNA para asegurar que el ribosoma esté en un marco de lectura adecuado para leer con propiedad el mensaje completo. (11.8)
Codones: secuencias de tres nucleótidos (tripletes nucleotídicos) que codifican los aminoácidos. (11.6)
Codones de terminación: tres de los 64 codones trinucleotídicos posibles cuya función es cesar el ensamble polipeptídico. (11.6)
Coeficiente de partición: relación de solubilidad de un soluto en aceite o agua; esta cuantificación es la medida relativa de polaridad de una sustancia biológica. (4.7)
Coenzima: componente orgánico, no proteínico, de una enzima. (3.2)
Cofactor: componente no proteínico de una enzima (puede ser inorgánico u orgánico). (3.2)
Cohesina: complejo multiproteínico que mantiene juntas las cromátides duplicadas entre sí hasta que se separan durante la división celular. (14.2)
Cola de poli(A): fragmento de residuos de adenosinas en el extremo 3′ de un mRNA que se agrega de manera postranscripcional. (11.4)
Colágenas: familia de glucoproteínas fibrosas conocidas por su gran fuerza de tensión que funcionan de manera exclusiva como parte de la matriz extracelular. (7.1)
Colesterol: compuesto encontrado en células animales que puede constituir más de la mitad de los lípidos de la membrana plasmática, con la proporción relativa en cualquier membrana y afectación de su fluidez. (4.3)
Compactación cromosómica: proceso en el cual una célula convierte sus cromosomas en estructuras más cortas y gruesas capaces de segregarse durante la mitosis o la meiosis. (14.2)
Complejo de cosecha ligera II: complejo de proteína-pigmento localizado fuera del fotosistema; contiene la mayoría de los pigmentos antena que colectan la luz para el fotosistema II. Este último puede también vincularse con el fotosistema I. (6.4)
Complejo de poro nuclear: complicado aparato en forma de red de básquetbol que llena el poro nuclear como una tapa y protege la salida hacia el citoplasma y el nucleoplasma. (12.1)
Complejo de preinicio: relación ensamblada de los factores generales de transcripción y la polimerasa de RNA; es necesaria antes de que inicie la transcripción del gen. (11.4)
Complejos de remodelación de la cromatina: complejos de proteínas formados por multisubunidades, que usan la energía liberada por la hidrólisis de ATP para alterar la estructura de la cromatina y permitir la unión de los factores transcripcionales en los puntos reguladores en el DNA. (12.4)
Complejo de unión de exones (EJC): complejo de proteínas que se deposita en el transcrito 20 a 34 nucleótidos corriente arriba de la unión exón-exón recién formada. Este conglomerado de proteínas permanece con el mRNA hasta que se traduce. (11.8)
Complejo del sinaptonema: estructura semejante a una escalera compuesta por tres barras paralelas con muchas fibras cruzadas. Los sinaptonemas mantienen cada par de cromosomas homólogos en una posición apropiada para permitir la continuación de la recombinación genética entre las cadenas de DNA. (14.3)
Complejo enzima-sustrato: relación física entre una enzima y su(s) sustrato(s) durante la cual se lleva a cabo la catálisis de la reacción. (3.2)
Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC): región del genoma que codifica las proteínas del MHC. Los genes que codifican estas proteínas son muy polimórficos y los representa un gran número de alelos diferentes. Estas diferencias genéticas entre seres humanos son importantes para la proclividad de una persona a rechazar un trasplante de otro individuo que no sea de un gemelo idéntico. (17.4)
Complejo multiproteínico: interacción de más de una proteína completa para formar un complejo funcional más grande. (2.5)
Complementariedad: relación entre la secuencia de bases en las dos cadenas de doble hélice del DNA. Las restricciones estructurales en la configuración

de las bases limitan la unión de los dos pares: adenina-timina y guanina-citosina. (10.2)

Complemento: sistema de proteínas del plasma sanguíneo que actúa como parte del sistema inmunitario innato para destruir microorganismos que invaden de forma directa (al tornar porosa la membrana plasmática) o indirecta (al hacer susceptible el organismo a la fagocitosis). (17.1)

Compuestos bioquímicos: compuestos sintetizados por organismos vivos. (2.4)

Conducción saltatoria: propagación de un impulso nervioso cuando un potencial de acción desencadena otro en el segmento adyacente de la membrana (p. ej., la propagación que da lugar a que el potencial de acción brinque de un nódulo de Ranvier al siguiente). (4.8)

Conductancia: movimiento de pequeños iones a través de las membranas. (4.7)

Conexón: complejo de multisubunidad de una unión comunicante formado en regiones dentro de la membrana plasmática de una proteína de membrana integral llamada conexina. Cada conexón posee seis subunidades de conexina dispuestos alrededor de una abertura central (o anulo) de 1.5 nm de diámetro. (7.5)

Conformación: ordenamiento tridimensional de los átomos dentro de una molécula, a menudo importante para entender la actividad biológica de las proteínas y otras moléculas en la célula viva. (2.5)

Congresión: movimiento de los cromosomas duplicados a la placa de metafase durante la prometafase de la mitosis. (14.2)

Cono de crecimiento: punta distal de una neurona en crecimiento, que contiene la actividad locomotriz necesaria para la prolongación axonal. (9.7)

Constante de equilibrio de una reacción (K_{eq}): relación de concentraciones de producto a las concentraciones de reactante cuando una reacción está en equilibrio. (3.1)

Constante de Michaelis (K_M): en cinética enzimática, el valor igual a la concentración de sustrato presente cuando la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. (3.2)

Constitutiva: aquella que ocurre de una manera continua y sin ninguna regulación. Puede relacionarse con un proceso normal, como la secreción constitutiva, o ser el resultado de una mutación que lleva a una interrupción de la regulación, la cual causa una actividad continua como la activación constitutiva de una vía de señalización.

Contraste: diferencia de aspecto entre las partes adyacentes de un objeto o un objeto y su fondo. (18.1)

Control a nivel de la traducción: determina cuándo un mRNA en particular se traduce y, si es así, con qué frecuencia y durante cuánto tiempo. (12.6)

Control a nivel del procesamiento: determinación de la vía por medio de la cual una transcripción primaria de RNA se procesa en un RNA mensajero que puede traducirse en un polipéptido. (12.4)

Control a nivel transcripcional: determina cuándo un gen particular se debe someter a transcripción y, si es así, con qué frecuencia. (12.4)

Control cualitativo: diferentes mecanismos celulares que aseguran que las proteínas y ácidos nucleicos sintetizados tengan estructuras apropiadas. Por ejemplo, las proteínas mal plegadas se translocan fuera del retículo endoplásmico y las destruyen proteosomas en el citosol; los mRNA que contienen codones de terminación prematura se reconocen y destruyen y los DNA que poseen alteraciones (lesiones) también se reconocen y reparan. (p. ej., 8.3)

Cotransporte: proceso que acopla el movimiento de dos solutos a través de una membrana; se denomina simporte si los dos solutos se mueven en la misma dirección y antiporte si lo hacen en sentidos opuestos. (4.7)

Crestas: los múltiples plegamientos profundos que son característicos de la membrana mitocondrial interna, que contiene la maquinaria molecular de la fosforilación oxidativa. (5.1)

Cristalografía de rayos X (difracción de rayos X): técnica en la cual se bombardean cristales de una proteína con un haz delgado de rayos X de una sola longitud de onda (haz monocromático). La radiación que los electrones de los átomos de la proteína dispersan (difractan) incide en una placa fotográfica u otro sensor. El patrón de difracción producido por el cristal es determinado por la estructura interna de la proteína. (2.5, 18.8)

Cromátides: miembros de los cromosomas mitóticos con forma de bastones apareados que en su conjunto representan los cromosomas duplicados formados durante la replicación en una interfase previa. (14.2)

Cromatina: material nucleoproteínico complejo que constituye los cromosomas de los eucariotas. (1.3)

Cromatografía: término empleado para aludir a una amplia variedad de técnicas en las cuales se fracciona una mezcla de compuestos disolventes a través de algún tipo de matriz inmóvil. (18.7)

Cromatografía de afinidad: técnica de purificación de proteínas que emplea las propiedades estructurales particulares de una proteína para permitir que la molécula se seleccione de forma específica a partir de una solución mientras las otras moléculas permanecen en solución. La solución se pasa a través de una columna en la cual una molécula interactúa de manera específica (p. ej., sustrato, ligando o antígeno) y se inmoviliza por la unión a un material inerte (la matriz). (18.7)

Cromatografía de intercambio iónico: técnica para purificar proteínas en la cual la carga iónica se emplea para separar diferentes proteínas. (18.7)

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): tipo de cromatografía de alta resolución en la cual se utilizan columnas estrechas y largas; la fase móvil se fuerza a través de una matriz muy empaquetada bajo alta presión. (18.7)

Cromosomas: estructuras en forma de madejas constituidas por el DNA nuclear de las células eucariotas y que son los portadores de la información genética. (10.1)

Cromosomas artificiales bacterianos (BAC): vectores de clonación capaces de aceptar fragmentos de DNA extraño que pueden clonarse en bacterias. Consisten en un plásmido F con un origen de replicación y genes requeridos para regular la replicación. Los BAC han tenido una función esencial en la secuencia del genoma. (18.16)

Cromosomas artificiales de levaduras: elementos de clonación para portar información genética que son versiones artificiales de cromosomas de levaduras normales. Contienen todos los elementos de un cromosoma de levadura necesarios para que la estructura se replique durante la fase S y segregue a las células hijas durante la mitosis, junto con un gen cuyo producto codificado permite a estas células que el YAC se seleccione respecto de aquellas que les falta el elemento y el fragmento de DNA a clonar. (18.16)

Cromosomas homólogos: cromosomas pareados de células diploides; cada uno lleva una de dos copias del material genético portado por el cromosoma. (10.1)

Cromosomas politénicos: cromosomas gigantes de insectos que contienen cadenas de DNA duplicadas, perfectamente alineadas, con tantas como 1 024 veces el número de cadenas de DNA de cromosomas normales. (10.1)

Cuerpo basal: estructura situada en la base de un cilio o flagelo la cual genera sus microtúbulos externos. Los cuerpos basales tienen estructura idéntica a los centriolos. Cada uno puede dar origen al otro. (9.3)

Cultivo celular: técnica utilizada para cultivar células fuera del organismo. (18.5)

Cultivo clonal: tipo de cultivo primario en el cual relativamente pocas células se agregan a la caja de cultivo, cada una de las cuales, después de colocarse y unirse a la superficie, se aísla de sus células próximas. La proliferación de

las células genera colonias individuales, o clones, de células cuyos miembros derivan de la misma célula original. (18.5)

Cultivo en masa: tipo de cultivo primario en el cual un gran número de células se agrega al plato de cultivo, donde se establecen, se unen a la parte inferior y forman una capa de células relativamente uniforme. (18.5)

Cultivo primario: cultivo de células obtenido directamente del organismo. (18.5)

Cultivo secundario: transferencia de células cultivadas a un medio de cultivo. (18.5)

Dalton: medida de masa molecular; equivalente a una unidad de masa atómica (p. ej., la masa de un átomo ^{1}H). (1.4)

Decaimiento mediado sin sentido: mecanismo de seguridad del mRNA que reconoce mRNA con codones de terminación prematura (sin sentido), que llevan a su destrucción. (11.8)

Deleción: aberración cromosómica que ocurre cuando una porción del cromosoma se pierde. (PH12)

Deleción: pérdida de un segmento de DNA por mal alineamiento de cromosomas homólogos durante la meiosis. (10.4)

Dendritas: prolongaciones finas de los cuerpos celulares de la mayoría de las neuronas; las dendritas reciben información entrante desde fuentes externas, típicamente otras neuronas. (4.8)

Depresiones cubiertas: dominios especializados de la membrana plasmática; sirven como puntos en que se acumulan sustancias que ingresan en una célula por medio de RME y se unen a receptores. (8.8)

Desacetilasas de histona (HDAC): enzimas que catalizan la eliminación de grupos acetilo de histonas centrales. Este proceso se vincula con la represión de la transcripción. (12.4)

Deshidrogenasa: enzima que cataliza una reacción de oxidorreducción para remover un átomo de hidrógeno de un reactante. (3.3)

Desmosomas (*maculae adherens*): uniones adhesivas con forma de disco que contienen caderinas y se encuentran en varios tejidos, sobre todo los epitelios, donde se localizan en las uniones adherentes y basales. Las placas citoplásmicas densas en la superficie interna de las membranas plasmáticas en esta región sirven como sitios de fijación para filamentos intermedios que se extienden hacia el citoplasma. (7.3)

Desnaturalización: pérdida del plegamiento o desorganización de una proteína a partir de su estado nativo. (2.5)

Desnaturalización: separación del DNA de doble hélice en dos cadenas sencillas. (10.4)

Despolarización: disminución de la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana. (4.8)

Diferencia de potencial: la diferencia de carga entre los dos compartimientos, a menudo medida como voltaje a los lados de la membrana. (4.7)

Diferencia estándar de energía libre ($\Delta G^{\circ\prime}$): la diferencia de energía libre cuando un mol de cada reactivo se convierte en un mol de cada producto bajo condiciones estándar definidas: temperatura de 298 K y presión de 1 atm. (3.1)

Diferenciación: proceso a través del cual una célula no especializada se torna más compleja y especializada en estructura y función. (1.3)

Difusión: proceso espontáneo en el que una sustancia se mueve de un área de alta concentración a una de baja, hasta alcanzar la misma concentración en todas las áreas. (4.7)

Difusión facilitada: proceso por el cual la velocidad de difusión normal de una sustancia se incrementa a través de la interacción con una proteína de membrana específica de sustancia. (4.7)

Dineína: proteína motora de multisubunidades, excepcionalmente grande, que se mueve a lo largo de los microtúbulos hacia su extremo terminal. Esta familia de proteínas se encuentra en las formas de dineína citoplásmica y dineínas del axonema. (9.3)

Dineína ciliar o axonémica: proteína de gran tamaño (más de dos millones de daltones) encargada de la conversión de la energía química del ATP en energía mecánica de la locomoción ciliar. (9.3)

Dineína citoplásmica: proteína de gran tamaño (peso molecular superior a un millón de daltones) compuesta de numerosas cadenas polipeptídicas. La molécula contiene dos cabezas globulares grandes que actúan como máquinas para generar fuerza. La evidencia sugiere que la dineína citoplásmica funciona en el movimiento de los cromosomas durante la mitosis y también como un extremo negativo del motor microtubular para el movimiento de vesículas y organelos membranosos a través del citoplasma. (9.3)

Diploide: aquel que contiene ambos miembros de cada par de cromosomas homólogos, como lo ejemplifica la mayoría de las células somáticas. Las células diploides proceden de células parentales diploides durante la mitosis. Se opone a haploide. (10.5, 14.3)

División celular: proceso por el que se originan nuevas células a partir de otros organismos vivos. (14)

DNA recombinante: moléculas que contienen secuencias de DNA derivadas de más de una fuente. (18.13)

Dominio PH: dominio de proteína que se une a los anillos de inositol fosforilado de los fosfoinosítidos unidos a la membrana. (15.2)

Dominio transmembrana: parte de una proteína de membrana que pasa por la bicapa lipídica, a menudo formada por aminoácidos no polares en una conformación de hélice α. (4.4)

Dominio: región alojada en el interior de una proteína que se pliega y funciona de una manera semiindependiente. (2.5)

Dominios SH_2: dominios con sitios de unión de alta afinidad para "regiones de fosfotirosinas". Se encuentran en diversas proteínas que intervienen en la señalización celular. (15.4)

Duplicación génica: duplicación de una pequeña porción de un cromosoma individual mediante un proceso de entrecruzamiento desigual. (10-5)

Efector: sustancia que vincula una respuesta celular con una señal. (15.1)

Electroforesis: técnicas de fraccionamiento de proteínas que dependen de la capacidad de las moléculas cargadas para migrar cuando se colocan en un campo eléctrico. (18.7)

Electroforesis en gel de poliacrilamida: técnica de fraccionamiento de proteínas en la cual las proteínas se manipulan mediante una corriente que se aplica a través del gel compuesto por pequeñas moléculas orgánicas (acrilamida) que tienen uniones cruzadas para formar una malla molecular. (18.7)

Electrogénico: cualquier proceso que contribuye de forma directa a una separación de carga a través de la membrana. (4.7)

Elementos de respuesta: sitios en que factores de transcripción específicos se unen a las regiones reguladoras de un gen. (12.4)

Elementos transponibles: segmentos de DNA que se mueven de un lugar en un cromosoma a un sitio por completo diferente, muchas veces con afectación de la expresión de los genes. (10.5)

Endocitosis: mecanismo para la captación de líquidos y solutos dentro de la célula. Se puede dividir en dos tipos: una fase de endocitosis completa, la cual no es selectiva, y la endocitosis mediada por receptor, que requiere unión de moléculas de soluto como las LDL o transferrina a un receptor específico de la superficie celular. (8.8)

Endonucleasas de restricción (enzimas de restricción): nucleasas contenidas en las bacterias que reconocen secuencias nucleotídicas cortas dentro del DNA dúplex y cortan las cadenas en sitios muy específicos en ambas cadenas del dúplex. (18.13)

Endosomas: organelos de la vía endocítica. Los materiales capturados por endocitosis se transportan a los **endo-**

somas tempranos donde se segregan y entonces los endosomas tardíos pasan a los lisosomas. Los **endosomas tardíos** también funcionan como sitios de destino de las enzimas lisosomales transportadas desde el aparato de Golgi. (8.8)

Energía: la capacidad para efectuar trabajo; existe en dos formas: potencial y cinética. (3.1)

Energía cinética: energía liberada de una sustancia a través de movimientos atómicos o moleculares. (3.1)

Energía de activación: energía cinética mínima necesaria para que un reactante sufra una reacción química. (3.2)

Energía potencial: energía almacenada que puede emplearse para realizar trabajo. (3.1)

Enfermedades autoinmunitarias: enfermedades reconocibles por un ataque del sistema inmunitario contra los propios tejidos del cuerpo. Son ejemplos la esclerosis múltiple, la diabetes mellitus dependiente de insulina y la artritis reumatoide. (PH17)

Enfoque isoeléctrico: tipo de electroforesis en el que las proteínas se separan de acuerdo con su punto isoeléctrico. (18.7)

Enlace amida: enlace químico que forman los ácidos carboxílicos y las aminas (o grupos funcionales acídicos y aminos) mientras producen una molécula de agua. (2.4)

Enlace covalente: tipo de enlace químico en el cual dos átomos comparten un par de electrones. (2.1)

Enlace glucosídico: enlace químico formado entre las moléculas de azúcares. (2.5)

Enlace iónico: enlace químico que ocurre entre iones con carga opuesta; también se conoce como puente salino. (2.2)

Enlace no covalente: enlace químico relativamente débil basado en las fuerzas de atracción entre regiones con carga opuesta dentro de una molécula o entre dos moléculas muy cercanas. (2.2)

Enlace peptídico: enlace químico que une aminoácidos a una proteína; dicho enlace se forma cuando el grupo carboxilo de un aminoácido reacciona con el grupo amino de un segundo aminoácido. (2.5)

Enlace tipo éster: enlace químico formado entre ácidos carboxílicos y alcoholes (o grupos funcionales acídicos y alcohólicos) mientras se produce una molécula de agua. (2.4)

Ensayo: características identificables de una proteína, como la actividad catalítica de una enzima, usadas para determinar la cantidad relativa de la proteína en una muestra. (18.7)

Entrecruzamiento (recombinación genética): se llama así al mezclado de genes en los cromosomas (con eliminación consecuente de los grupos de ligamiento) que ocurre durante la meiosis como resultado de la rotura y reunión de segmentos de cromosomas homólogos. (10.1)

Entropía (*S*): una medida del desorden relativo de un sistema o universo relacionado con movimientos aleatorios de la materia; debido a que todos los movimientos cesan en el punto absoluto (0 K), la entropía es cero sólo a esta temperatura. (3.1)

Envoltura nuclear: complejo de estructuras de doble membrana que divide al núcleo eucariota de su citoplasma. (12.1)

Enzima: proteína catalítica de importancia vital en las reacciones celulares. (3.2)

Epitopo (o determinante antigénico): porción de un antígeno que se une al sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo específico. (17.4)

Esfingolípidos: clase de lípidos de membrana (derivados de esfingosina) que constan de esfingosina unida a un ácido graso por su grupo amino. (4.3)

Espaciador no transcrito: región de un grupo génico que no se transcribe. Los espaciadores no transcritos están presentes entre varios tipos de genes repetidos en tándem, incluidos los de tRNA, rRNA e histonas. (11.3)

Espacio de la cisterna (luminal): región del citoplasma incluida o limitada por las membranas del retículo endoplásmico del aparato de Golgi. (8.3)

Espacio intermembranoso: espacio entre las membranas mitocondriales interna y externa. (5.1)

Espacio luminal (de cisterna): región de contenido líquido del citoplasma encerrada por la membrana del retículo endoplásmico o el aparato de Golgi. (8.3)

Especificidad: propiedad de interacción selectiva entre componentes de una célula que es fundamental para la vida. (2.5)

Espectro de absorción: gráfica de la intensidad de luz absorbida en relación con su longitud de onda. (6.3)

Espectro de acción: gráfica de la rapidez (o eficiencia) relativa de un proceso producido por luz de diversas longitudes de onda. (6.3)

Espectrofotómetro: instrumento utilizado para medir la cantidad de luz de una longitud de onda específica que absorbe una solución. Si se conocen las características de absorbancia de una molécula particular, entonces la cantidad de luz de la longitud de onda apropiada absorbida por una solución de esta molécula provee una medida sensible o precisa de su concentración. (18.7)

Espectrometría de centelleo líquido: técnica para medir la cantidad de radiactividad presente en una muestra; se basa en la propiedad de ciertas moléculas, denominadas fósforos o centelleos, de absorber la energía que emite una partícula y liberarla en forma de luz. (18.4)

Espectrometría de masas: metodología para identificar moléculas (incluidas las proteínas). Una proteína o mezcla de ellas se fragmenta, se convierte en iones gaseosos y se hace pasar a través de un componente tubular de un espectrómetro de masas, lo que da lugar a que los iones se separen de acuerdo con su relación masa/carga (m/z). La identificación de las proteínas se realiza por medio de la comparación con un banco de datos en computadora de la secuencia de proteínas codificadas por un genoma particular. (2.5, 18.7)

Espliceosoma: complejo macromolecular que contiene gran número de proteínas y un número variable de partículas ribonucleicas que funcionan en la eliminación de intrones a partir de un transcrito primario. (11.4)

Esporofito: estado diploide del ciclo de vida de las plantas que comienza con la unión de dos gametos para formar un cigoto. Durante el estado de esporofito tiene lugar la meiosis y se producen esporas que germinan directamente en un gametofito haploide. (14.3)

Estado basal (o fundamental): estado no excitado de un átomo o molécula. (6.3)

Estado de transición: punto durante una reacción química en el cual los enlaces se rompen y se forman de nueva cuenta para crear los productos. (3.2)

Estado estable: condición metabólica en la cual las concentraciones de reactantes y productos son en esencia constantes, a pesar de que las reacciones individuales pueden no estar en equilibrio. (3.1)

Estado excitado: configuración electrónica de una molécula después de la absorción de un fotón que ha energizado un electrón para cambiar de un orbital interno a uno externo. (6.3)

Estereoisómeros: dos moléculas que, desde el punto de vista estructural, son imágenes especulares la una de la otra y pueden tener grandes diferencias en actividad biológica. (2.5)

Esteroides: grupos lipídicos basados en las características del esqueleto hidrocarbonado de cuatro anillos; incluyen el colesterol y hormonas como la testosterona y la progesterona. (2.5)

Estoma: abertura en la superficie de las hojas a través de la cual pueden intercambiarse el gas y el agua entre la planta y el aire. (6.6)

Estroma: espacio fuera del tilacoide, pero dentro de la membrana interna, relativamente impermeable de la envoltura del cloroplasto. (6.1)

Estructura cuaternaria: organización tridimensional de una proteína que tiene más de una cadena polipeptídica o subunidades. (2.5)
Estructura primaria: secuencia lineal de aminoácidos en una cadena polipeptídica. (2.5)
Estructura secundaria: el ordenamiento tridimensional de porciones de una cadena polipeptídica. (2.5)
Estructura terciaria: una forma tridimensional de una macromolécula entera. (2.5)
Eucromatina: cromatina que regresa a su estado disperso durante la interfase. (12.1)
Exocitosis: proceso de fusión de membranas y descarga del contenido durante el cual la membrana de un gránulo secretor entra en contacto con la membrana plasmática con la cual se fusiona; de esa manera se forma una abertura a través de la cual el contenido del gránulo puede liberarse. (8.5)
Exones: partes de un gen procesado que contribuye al producto de un RNA maduro. (11.4)
Exonucleasa: enzima digestiva de DNA o RNA que se une a los extremos 5′ o 3′ de la cadena del ácido nucleico y remueve un nucleótido a la vez desde un extremo. (p. ej., 12.6, 13.1)

Factores de inicio: proteínas solubles (IF en bacterias y eIF en eucariotas) que hacen posible el inicio de la traducción. (11.8)
Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina: proteínas que se unen a proteínas G y estimulan el intercambio del GDP unido a un GTP, con lo cual se activa la proteína G. (15.4)
Factores transcripcionales: proteínas auxiliares (aparte los ocho a 14 polipéptidos distintos que forman las polimerasas) que se unen a sitios específicos en el DNA y alteran la transcripción de los genes cercanos. (11.2, 12.4)
Factores transcripcionales generales: proteínas auxiliares necesarias para que la polimerasa de RNA inicie la transcripción. Estos factores se denominan “generales” debido a que se requieren para la transcripción de diferentes ordenamientos de genes por medio de la polimerasa. (11.4)
Fagocitosis: proceso mediante el cual las células capturan materiales particulados. Los materiales quedan encerrados en la membrana plasmática, la cual aflora en el citoplasma para formar una vesícula llamada fagosoma. (8.8)
Familias: agrupamientos de proteínas originadas a partir de un mismo gen ancestral común que experimentó una serie de duplicaciones y modificaciones posteriores durante el transcurso de la evolución. (2.5)
Fase M: estado del ciclo celular que incluye el proceso de mitosis, durante el cual los cromosomas duplicados se separan en dos núcleos, y la citocinesis, durante la cual la célula se divide físicamente en su totalidad en dos células hijas. (14.1)
Fase S: fase del ciclo celular en la cual ocurre la replicación. (14.1)
Fermentación: vía metabólica anaerobia en la cual el piruvato se convierte en una molécula más simple (a menudo lactato o etanol, según sea el organismo) y el NAD^+ se regenera para utilizarse en la vía metabólica temprana para el catabolismo de la glucosa, la glucólisis. (3.3)
Fibra muscular: célula musculoesquelética que se describe como una fibra muscular debido a su estructura en forma de cable muy ordenada; la fibra es multinucleada y la componen cientos de tiras cilíndricas delgadas. (9.6)
Fijación de nitrógeno: proceso mediante el cual el gas nitrógeno se reduce y convierte de forma química en un elemento de compuestos orgánicos. (1.3)
Fijador: solución química que mata a las células por una rápida penetración en la membrana celular, con inmovilización de todos sus materiales macromoleculares; de esa forma la estructura de la célula se mantiene muy parecida al estado vivo. (18.1)
Filamentos delgados: uno de los dos distintos tipos de filamentos que confieren a las sarcómeras su apariencia típica. Los filamentos delgados tienen de manera primaria actina y están dispuestos en un ordenamiento hexagonal alrededor de los filamentos gruesos; cada filamento delgado se halla entre dos filamentos gruesos. (9.6)
Filamentos gruesos: uno de los dos tipos distintos de filamentos que suministran a las sarcómeras su apariencia característica. Los filamentos gruesos se integran de manera primaria con miosina y están rodeados por una configuración hexagonal de filamentos delgados. (9.6)
Filamentos intermedios: fibras del citoesqueleto fuertes en forma de cuerdas de unos 10 nm de diámetro que, según sea el tipo celular, pueden componerse de una variedad de subunidades de proteínas capaces de ensamblarse en tipos similares de filamentos. Los filamentos intermedios proveen al parecer estabilidad mecánica a las células y tienen funciones específicas de tejido. (9.4)
Filtración en gel: técnica de purificación en la cual la separación de proteínas (o ácidos nucleicos) se basa de manera primaria en la masa molecular. La separación de material consiste en esferas de pequeños poros que se empaquetan en una columna a través de la cual pasa con lentitud la solución de proteínas. (18.7)
Flagelos: organelos móviles parecidos a pelos que se proyectan desde la superficie de diversas células eucariotas. Esencialmente tienen la misma estructura que los cilios pero están presentes en mucho menor número. (9.3)
Flavoproteínas: un tipo de acarreador de electrones en el cual un polipéptido se une a uno de los dos grupos prostéticos relacionados, sea FAD o FMN. (5.3)
Fluidez de membrana: propiedad del estado físico de la bicapa lipídica de una membrana que permite la difusión de lípidos y proteínas membranosas dentro del plano de la membrana. Se relaciona de manera inversa con la viscosidad de ésta. La fluidez de la membrana se incrementa conforme se eleva la temperatura y en bicapas con más lípidos insaturados. (4.5)
Focos de duplicación: localización de horquillas de duplicación activas en el núcleo celular. Existen unos 50 a 250 focos, cada uno de los cuales contiene alrededor de 40 horquillas de duplicación que incorporan nucleótidos en cadenas de DNA simultáneamente. (13.1)
Fosfato de dolicol: molécula hidrófoba elaborada con más de 20 unidades de isopreno que ensamblan la parte basal o nuclear de los segmentos de las cadenas de carbohidratos para crear glucoproteínas. (8.3)
Fosfoglicéridos: nombre dado a los fosfolípidos de membrana que se forman en el esqueleto de glicerol. (4.2)
Fosfoinosítidos: incluyen diversos derivados fosforilados del fosfatidilinositol (p. ej., PIP, PIP_2 y PIP_3) que sirven como segundos mensajeros en las vías de señalización. (15.3)
Fosfolipasa C: enzima que cataliza una reacción que divide al PIP_2 en dos moléculas: 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) y diacilglicerol (DAG), ambos con importantes funciones como segundos mensajeros en la señalización celular. (15.3)
Fosfolípidos: lípidos que contienen fosfato; son los constituyentes primarios de la bicapa lipídica de una membrana celular. Los fosfolípidos incluyen fosfoglicéridos y esfingomielina. (4.3)
Fosforilación a nivel del sustrato: síntesis directa de ATP a través de la transferencia de un grupo fosfato de un sustrato al ADP. (3.3)
Fosforilación oxidativa: formación de ATP controlada por energía derivada de los electrones de alta energía removidos durante la oxidación del sustrato en las vías metabólicas, como el ciclo del TCA, en el cual la energía se libera debido a la formación de ATP por el paso de los electrones a través de la

cadena transportadora de electrones en la mitocondria. (5.3)

Fotoautótrofos: un autótrofo que usa la energía radiante del Sol para convertir CO_2 en compuestos orgánicos. (6)

Fotofosforilación cíclica: formación de ATP en los cloroplastos que realiza el fotosistema I sin la intervención del fotosistema II. (6.5)

Fotofosforilación no cíclica: formación de ATP durante el proceso de fotosíntesis que libera oxígeno y en el cual los electrones se mueven en una forma lineal de H_2O a $NADP^+$. (6.5)

Fotólisis: rotura de la molécula de agua durante la fotosíntesis. (6.4)

Fotón: paquete de energía luminosa. Cuanto más corta sea la longitud de onda, mayor la energía de los fotones. (6.3)

Fotorrespiración: una serie o conjunto de reacciones en las cuales el O_2 se une a la enzima RuBP; al final resulta en la liberación del CO_2 recién fijado de la planta. (6.6)

Fotosíntesis: la vía para convertir la energía de la luz solar en energía química utilizada por los organismos vivos. (3.16)

Fotosistema I: uno de los dos complejos pigmentarios, separados desde el punto de vista espacial, necesarios para transferir energía de un par de electrones, lo suficiente para remover éstos de una molécula de agua y transferirlos al $NADP^+$. El fotosistema I toma electrones desde un nivel de energía cercano al punto medio hasta un nivel de energía arriba del $NADP^+$. (6.4)

Fotosistema II: uno de los dos complejos pigmentarios, separados espacialmente, necesarios para tomar la energía de un par de electrones, lo suficiente para extraer a éstos de una molécula de agua y transferirlos al $NADP^+$. El fotosistema II toma electrones de un nivel de energía inferior al del agua en el punto superior de la energía a través de un punto intermedio. (6.4)

Fracción altamente repetida: secuencias de DNA casi siempre cortas (de pocos cientos de nucleótidos de longitud) presentes en al menos 10^5 copias por genoma. Las secuencias altamente repetidas representan 10% del DNA de los vertebrados. (10.4)

Fracción moderadamente repetida: aquellas secuencias de DNA que se repiten desde unos cuantos hasta varios cientos de miles de veces dentro del genoma eucariota. La fracción de secuencias moderadamente repetida del DNA llega a variar de 20 a casi 80% del DNA total. Estas secuencias pueden ser idénticas la una a la otra o no idénticas pero relacionadas. (10.4)

Fracción no repetida: secuencias en el genoma que están presentes sólo en una copia por grupo de cromosomas haploides. Estas secuencias contienen la cantidad más grande de información genética, incluidos los códigos para casi todas las proteínas, además de las histonas. (10.4)

Fraccionamiento: desensamble de una preparación en sus ingredientes constitutivos para examinar las propiedades de las especies moleculares individuales. (18.7)

Fraccionamiento celular: separación de diferentes organelos celulares por medio de centrifugación diferencial. (8.2)

Fraccionamiento subcelular: método que permite separar entre sí diferentes organelos (p. ej., núcleo, mitocondria, membrana plasmática, retículo endoplásmico) con distintas propiedades. (8.2)

Fragmentos de Okazaki: pequeños segmentos de DNA, sintetizados de manera previa y ligados con rapidez para elaborar grandes piezas y formar la cadena retrasada. (13.1)

Fragmoplasto: material denso alineado en el plano ecuatorial de la placa de metafase previa en las células de plantas; tiene conjuntos de microtúbulos interdigitados orientados en sentido perpendicular hacia la placa celular futura, junto con algún tipo de material electrodenso vinculado. (14.3)

Fuerza de movimiento con protones (Δp): gradiente electroquímico que se construye a través de las membranas transductoras de energía (membrana mitocondrial interna, membrana tilacoide, membrana plasmática bacteriana) seguidas de la translocación de los protones durante el transporte electrónico. La energía del gradiente, compuesta por un gradiente de pH y un voltaje y que se mide en voltios, se emplea en la formación de ATP. (5.4)

Fuerza reductora: el potencial de una célula para reducir intermediarios metabólicos en productos, casi siempre medido por el tamaño de la poza de NADPH. (3.3)

Fuerzas de van der Waals: fuerza de atracción débil consecutiva a las asimetrías transitorias de carga entre los átomos o moléculas adyacentes. (2.2)

Fusión celular: técnica en la que dos tipos celulares diferentes (de un organismo o diferentes especies) se unen para producir una célula única, con una membrana plasmática continua. (4.6)

G_1: periodo dentro del ciclo celular que sigue a la mitosis y precede al inicio de la síntesis de DNA. (14.1)

G_2: periodo del ciclo celular entre el final de la síntesis del DNA y el inicio de la fase M. (14.1)

Gametofito: estado haploide del ciclo de vida de las plantas que comienza con la generación de esporas durante el estado esporofito. Durante el estado gametofito, los gametos se forman a través del proceso de la mitosis. (14.3)

Gen regulador: aquel que codifica proteínas de represión. (12.2)

Genes: en términos no moleculares es la unidad de la herencia que domina el carácter de una característica particular. En términos moleculares es un segmento de DNA que contiene la información de un solo polipéptido o molécula de RNA, incluidas las regiones transcritas pero no las regiones no codificantes. (10.1)

Genes estructurales: genes que codifican moléculas proteínicas. (12.2)

Genes procesados: genes con las secuencias interpuestas. (11.4)

Genes supresores de tumores: aquellos genes codificadores de proteínas que limitan el crecimiento celular e impiden que las células se tornen malignas. (16.3)

Genoma: complemento de la información genética único para cada especie de organismos; es equivalente al DNA de un grupo haploide de cromosomas de estas especies. (10.4)

Girasa de DNA: tipo de topoisomerasa capaz de cambiar el estado de superenrollamiento de una molécula de DNA tras eliminar la tensión que se produce durante la replicación. Esto lo realiza al discurrir a lo largo del DNA y actuar como una “manivela”, con lo que se cambia el DNA superenrollado de forma positiva a un DNA superenrollado de manera negativa. (13.1)

Glioxisomas: organelos encontrados en células de plantas que sirven como sitios para reacciones enzimáticas que incluyen la conversión de ácidos grasos almacenados en carbohidratos. (5.6)

Glucocáliz: capa unida a la superficie externa de la membrana plasmática. Contiene carbohidratos de membrana junto con materiales extracelulares secretados por la célula dentro del espacio externo, donde permanecen en estrecha relación con la superficie celular. (7.1)

Glucógeno: polímero de glucosa muy ramificado que sirve como fuente de energía química disponible en la mayoría de las células animales. (2.5)

Glucolípidos: moléculas de lípidos basadas en esfingosina unidas a los carbohidratos; a menudo son componentes activos de la membrana plasmática. (4.3)

Glucólisis: primera vía del catabolismo de la glucosa; no requiere oxígeno y da lugar a la formación de piruvato. (3.3)

Glucosaminoglucanos (GAG): grupo de polisacáridos de elevada acidez con la estructura –A–B–A–B–, donde A y B representan dos azúcares distintos. (2.5)

Glucosilación: aquellas reacciones por medio de las cuales los grupos de azúcares se agregan a las proteínas y los lípidos. (4.3, 8.3, 8.4)
Glucosiltransferasas: una familia grande de enzimas que transfieren azúcares específicos de un donante (un azúcar de nucleótido) a un receptor particulares (por lo general el extremo en crecimiento de una cadena de oligosacárido). (8.3)
Gradiente electroquímico: diferencia general de carga eléctrica y concentración de solutos que determina la capacidad de un electrólito de difundirse entre dos compartimientos. (4.7)
Grana: disposición ordenada de los tilacoides. (6.1)
Gránulos de secreción: estructuras grandes rodeadas por membrana, densamente empaquetadas, que contienen materiales de secreción muy concentrados que se liberan al espacio extracelular después de una señal de estimulación. (8.1, 8.5)
Grasas: polímeros que poseen un esqueleto de glicerol unido mediante enlaces tipo éster a tres ácidos grasos, también llamados triacilgliceroles. (2.5)
Grupo principal: región polar, y soluble en agua, de un fosfolípido; se integra con un grupo fosfato unido a una de varias moléculas hidrófilas pequeñas. (4.3)
Grupo prostético: porción de una proteína que no está compuesta de aminoácidos, como el grupo hem dentro de la hemoglobina y la mioglobina. (2.5)
Grupos de conexión: grupos de genes que residen en el mismo cromosoma e incluyen la segregación dependiente de las características controladas por esos genes. (10.1)
Grupos funcionales: grupos de átomos que tienden a actuar como una unidad y afectan con frecuencia el comportamiento físico y químico de un gran número de moléculas orgánicas a las cuales pertenecen. (2.4)

Haploide: aquel que contiene sólo un miembro de cada par de cromosomas homólogos. Las células haploides se generan durante la meiosis, como lo ejemplifica el espermatozoo. Es lo contrario de diploide. (10.4, 14.3)
Haplotipo: un bloque del genoma que tiende a heredarse de forma intacta de una generación a otra. Por lo regular, los haplotipos se definen por la presencia de una combinación consistente de polimorfismos de un solo nucleótido. (PH10)
Helicasa: proteína que desenrolla el DNA (o RNA) dúplex en una reacción en la cual la energía se libera por la hidrólisis de ATP y se emplea para romper los puentes de hidrógeno que mantienen juntas a las dos cadenas. (13.1)
Hélice alfa (α): estructura secundaria posible de un polipéptido en la cual el esqueleto de la cadena forma una conformación espiral (en hélice). (2.5)
Hemicelulosas: polisacáridos ramificados de la célula vegetal cuyo esqueleto consta de un azúcar, como glucosa, y cadenas laterales de otros azúcares, como xilosa. (7.6)
Hemidesmosoma: estructura adhesiva especializada de la superficie basal de las células epiteliales cuya función es unir a esas células a la membrana basal subyacente. El hemidesmosoma contiene una placa densa en la superficie interna de la membrana plasmática, la cual posee filamentos de queratina que sobresalen en el citoplasma. (7.2)
Hemólisis: permeabilización de las membranas de los glóbulos rojos; a nivel experimental se observa al colocar las células en solución hipotónica, donde se rompen, liberan sus contenidos celulares y dejan sólo las membranas fantasmas. (4.6)
Hendidura sináptica: espacio estrecho entre dos células. Una célula presináptica envía impulsos hacia una sinapsis; una célula postsináptica siempre se encuentra en el lado receptor de una sinapsis. (4.8)
Herencia epigenética: transformaciones hereditarias, por ejemplo, cambios que pueden transmitirse de una célula a su progenie, que no implican cambios en la secuencia del DNA. Los cambios epigenéticos pueden resultar de la metilación del DNA, modificación covalente de histonas y con frecuencia otros tipos de modificaciones de la cromatina. (12.1, 12.4)
Heterocromatina: cromatina que permanece condensada durante la interfase. (12.1)
Heterocromatina constitutiva: cromatina que permanece en el estado condensado en las células durante todo el tiempo y representa el DNA silenciado. De manera primaria consiste en secuencias muy repetidas. (12.1)
Heterocromatina facultativa: cromatina inactivada de manera específica durante ciertas fases de la vida de un organismo. (12.1)
Heterótrofo: organismo que depende de una fuente externa de componentes orgánicos. (6.1)
Hibridación de ácido nucleico: variedad de técnicas relacionadas que se basan en que las dos moléculas de ácidos nucleicos de cadena sencilla de secuencia de bases complementaria forman un híbrido de doble cadena. (18.11)
Hibridación in situ: técnica que se utiliza para localizar una secuencia de DNA o RNA en particular en una célula o una placa de cultivo o electroforesis en gel. (10.3, 18.11)
Hibridación in situ y fluorescencia (FISH): técnica en la cual sondas de DNA (o RNA) se marcan con tintes fluorescentes, se hibridan con DNA monocatenario que permanece dentro de su cromosoma, y se localizan al microscopio de fluorescencia. (10.4)
Hibridomas: células híbridas producidas por la fusión de una célula linfocítica normal productora de anticuerpos y una célula del mieloma maligno. Los hibridomas proliferan y producen grandes cantidades de un solo anticuerpo (monoclonal) sintetizadas por una célula normal antes de la fusión con la célula del mieloma. (18.19)
Hidrocarburos: el grupo más simple de las moléculas orgánicas, integrado sólo por carbón e hidrógeno. (2.4)
Hidrófilo: tendencia de las moléculas polares a interactuar con las moléculas de agua circundantes, las cuales también son polares; literalmente, “que ama al agua”. (2.2)
Hidrolasas ácidas: enzimas hidrolíticas con actividad óptima a pH ácido. (8.6)
3-hidroxicinasa de fosfatidilinositol (o PI3K): uno de los efectores mejor estudiados que contiene dominios SH_2. Los productos de la enzima sirven como precursores para diferentes mensajeros celulares que poseen inositol y diferentes funciones en las células. (15.4)
Hipertónico: propiedad de un compartimiento que posee una elevada concentración de soluto en comparación con un compartimiento particular. (4.7)
Hipótesis del bamboleo: propuesta de Crick según la cual los requerimientos estéricos entre el anticodón del tRNA y el codón del mRNA son flexibles en la tercera posición, lo cual permite que dos codones que difieren sólo en la tercera posición compartan el mismo tRNA durante la síntesis de proteínas. (11.7)
Hipotónico: propiedad de un compartimiento de presentar una concentración baja de solutos respecto de un compartimiento particular. (4.7)
Histonas: colección de proteínas básicas de cromatina pequeñas y bien definidas. (12.1)
hnRNP (ribonucleoproteína nuclear heterogénea: resultado de la transcripción de cada hnRNA mayor, que se une a una amplia variedad de proteínas; es el sustrato para las reacciones de procesamiento que siguen. (11.4)
Hoja beta (β) plegada: estructura secundaria posible de un polipéptido en la cual diferentes cadenas beta están dispuestas de forma paralela y crean una conformación de hoja. (2.5)
Homogeneizar: rotura experimental de las células. (8.2)

Horquillas de replicación: puntos donde los apareamientos de segmentos replicados de DNA permanecen juntos y unen los segmentos no replicados. Cada una de las horquillas de replicación corresponde al sitio en el que: a) la doble hélice parental sufre separación y b) los nucleótidos se incorporan en cadenas complementarias resintetizadas. (13.1)
Huella génica: expresión diferencial de genes que depende tan sólo de si contribuyeron con el cigoto por medio del espermatozoo o el óvulo. (12.4)
Huso mitótico: "máquina" que contiene microtúbulos que funcionan en la organización y separación de cromosomas duplicados durante la división mitótica celular. (14.2)

Impulso nervioso: proceso a través del cual un potencial de acción se propaga a lo largo de la membrana de una neurona por activación secuencial de potenciales de acción en segmentos adyacentes de la membrana. (4.8)
In vitro: fuera del organismo. Se dice que las células cultivadas se desarrollan in vitro; las investigaciones con cultivos celulares son una herramienta esencial para los biólogos celulares y moleculares. (1.2)
Inductor: compuesto que se une a un represor proteínico y activa la transcripción de un operón bacteriano. (12.2)
Inestabilidad dinámica: término que relaciona las propiedades de ensamble y desensamble de los extremos positivos de un microtúbulo. El concepto describe el hecho de que el crecimiento y disgregación de los microtúbulos puede coexistir en la misma región de una célula y que un microtúbulo particular puede cambiar hacia atrás o hacia adelante de forma impredecible entre las fases de crecimiento y acortamiento. (9.3)
Inflamación: acumulación localizada de líquido y leucocitos en respuesta a una lesión o infección; puede ocasionar rubor, tumor y calor. (17.1)
Inhibición por retroalimentación: mecanismo de control de las vías metabólicas en el que el producto terminal interactúa con la primera enzima de la vía y cuyo resultado es la inhibición de la enzima. (3.3)
Inhibidor competitivo: inhibidor enzimático que compite con las moléculas del sustrato para acceder al sitio activo. (3.2)
Inhibidor enzimático: cualquier molécula que pueda unirse a una enzima y disminuir su actividad; se clasifica como no competitivo o competitivo con base en la naturaleza de la interacción con la enzima. (3.2)
Inhibidor irreversible: inhibidor enzimático que se une de manera estrecha, a menudo de forma covalente, de tal modo que la molécula enzimática se inactiva permanentemente. (3.2)
Inhibidor no competitivo: inhibidor enzimático que no se une al mismo sitio del sustrato y de esta forma el nivel de inhibición depende sólo de la concentración del inhibidor. (3.2)
Inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina: proteínas que se unen a las proteínas G e inhiben la disociación de la unión a GDP, lo que mantiene a la proteína G en un estado inactivo. (15.4)
Iniciador: cadena de DNA que provee a la polimerasa de DNA el 3′ OH terminal necesario. (13.1)
Inmunidad: estado en el cual el cuerpo no es susceptible a infecciones por un patógeno particular. (17)
Inmunidad celular: inmunidad a cargo de linfocitos T, los cuales cuando se activan pueden reconocer y destruir específicamente una célula infectada (o ajena). (17.1)
Inmunidad humoral: inmunidad mediada por anticuerpos sanguíneos. (17.1)
Inmunofluorescencia directa: técnica que emplea anticuerpos como sondas para localizar antígenos a nivel intracelular, en los cuales los anticuerpos se conjugan con moléculas fluorescentes pequeñas para formar derivados que entonces se incuban con las células o secciones de éstas. Los sitios de unión se visualizan por medio de microscopia fluorescente. (18.19)
Inmunofluorescencia indirecta: una variación de la inmunofluorescencia directa en la cual las células se tratan con anticuerpos no marcados, los cuales se permite que formen un complejo con el antígeno correspondiente. La localización del acoplamiento antígeno-anticuerpo se revela entonces en un segundo paso mediante una preparación de anticuerpos marcados con fluorescencia, cuyos sitios de combinación se dirigen contra las moléculas del anticuerpo utilizado en el primer paso. (18.19)
Integrinas: una superfamilia de proteínas integrales de membrana que se unen de manera específica a las moléculas extracelulares. (7.2)
Interacción hidrófoba: tendencia de las moléculas apolares a agregarse de tal forma que minimizan sus interacciones colectivas con las moléculas polares del agua circundante; literalmente, que "huye del agua". (2.2)
Intercambio de exones: movimiento de "módulos" genéticos entre diferentes genes facilitado por la presencia de intrones; éstos actúan como elementos espaciadores inertes entre exones. (11.4)
Interfase: la porción del ciclo celular entre los periodos de la división celular. (14.1)
Intermediario metabólico: compuesto producido durante un paso de una vía metabólica. (2.4)
Intrones: partes o secciones de un gen que sufrió *splicing* que corresponden a las secuencias interpuestas. (11.4)
Inversión: aberración cromosómica que se produce después de que un cromosoma se rompe en dos partes y el centro del segmento resultante se reincorpora en el cromosoma en un orden inverso. (PH12)
Ion: un átomo o molécula con una carga neta ya sea positiva o negativa debido a que ha perdido o ganado uno o más electrones durante una reacción química. (2.1)
Isoformas: diferentes versiones de una proteína. Genes relacionados o separados pueden codificar a las isoformas o bien éstas configurarse como variantes de *splicing* alternativo de un solo gen. (2.5)
Isómeros estructurales: moléculas que tienen la misma fórmula pero diferentes estructuras. (2.4)
Isotónico: propiedad de un compartimiento con la misma concentración de soluto que otro compartimiento dado. (4.7)

Lamelipodio: el extremo guía de un fibroblasto en movimiento, el cual se extiende por fuera de la célula como una proyección aplanada y amplia que repta sobre el sustrato. (9.7)
Lámina nuclear: mezcla fibrilar y densa compuesta por filamentos intermedios que limita la superficie interna de la envoltura nuclear. (12.1)
Lentes objetivos: lentes del microscopio óptico que enfocan los rayos luminosos en la muestra para crear una imagen aumentada y real del objeto dentro de la columna del microscopio. (18.1)
Ligando: cualquier molécula que se una con un receptor en virtud de que éste posee una estructura complementaria. (4.1, 15.1)
Ligasa de DNA: enzima encargada de unir fragmentos de DNA y formar una cadena continua. (13.1)
Límite de resolución: la resolución que obtiene un microscopio se limita por la longitud de onda de la iluminación de acuerdo con la ecuación $D = 0.61\ \lambda/n$ sen α, donde D es la distancia mínima que dos puntos deben estar separados en el espécimen para que se resuelva, λ es la longitud de onda de la luz y n es el índice de refracción del medio. α es una medida de la capacidad para captar luz de las lentes y se relaciona de modo directo con su abertura. Para los microscopios de luz, el límite de resolución es ligeramente menor de 200 nm. (18.1)

Línea celular: células que se usan comúnmente en estudios de cultivo de tejidos y que han sufrido modificaciones genéticas que les permiten proliferar indefinidamente. (18.5)

Linfocitos: leucocitos nucleados (células blancas de la sangre) que circulan entre la sangre y los órganos linfáticos que median la inmunidad adquirida. Incluyen las células B y T. (17)

Linfocitos B (células B): aquellos que responden a los antígenos por medio de la proliferación y diferenciación a células plasmáticas que secretan anticuerpos sanguíneos. Estas células logran su estado diferenciado en la médula ósea. (17.2)

Linfocitos T (células T): linfocitos que responden a un antígeno por proliferación y diferenciación en otros linfocitos T citotóxicos que atacan y destruyen a las células infectadas o células T_H que se requieren para la producción de anticuerpos por las células B. Estas células adquieren sus estados diferenciados en el timo. (17.2)

Lípidos: moléculas orgánicas apolares, entre ellas las grasas, esteroides y fosfolípidos, cuya imposibilidad de disolverse en agua contribuye en buena medida a su actividad biológica. (2.5)

Liposoma: bicapa lipídica artificial que se agrega en una vesícula esférica o vesículas cuando se encuentra en un ambiente acuoso. (4.3)

Locus: la posición de un gen en un cromosoma. (10.1)

Macromoléculas: aquellas moléculas que están muy organizadas y son muy grandes, cruciales en la estructura y función de las células; se dividen en polisacáridos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. (2.4)

Mapa de restricción: tipo de mapa físico del cromosoma basado en la identificación y ordenamiento de grupos de fragmentos generados por las enzimas de restricción. (10.5)

Mapa genético: asignación de marcadores genéticos en posiciones relativas en un cromosoma con base en la frecuencia de entrecruzamientos. (10.5)

Material pericentriolar: material electrodenso y amorfo que rodea a los centriolos en una célula animal. (9.3)

Matriz: uno de dos compartimientos acuosos de la mitocondria; la matriz se localiza en el interior del organelo; el segundo compartimiento se denomina espacio **intermembranoso** y se localiza entre las membranas mitocondrial externa y la interna. (5.1)

Matriz extracelular: red organizada de materiales extracelulares que se extiende más allá de la proximidad inmediata de la membrana plasmática. Puede desempeñar una función integral para determinar la forma y actividad de la célula. (7.1)

Matriz mitocondrial: compartimiento acuoso dentro de una mitocondria. (5.1)

Matriz nuclear: red de proteínas fibrilares insolubles que establecen uniones cruzadas a través del espacio nuclear. (12.1)

Meiosis: proceso durante el que el número de cromosomas se reduce de tal forma que las células formadas contienen sólo un miembro de cada par de cromosomas homólogos. (14.3)

Membrana basal (lámina basal): sustrato grueso de 50 a 200 nm de la matriz extracelular que rodea al músculo y las células de grasa y limita la superficie basal de los tejidos epiteliales, como la piel, los tejidos internos del aparato digestivo y respiratorio y los límites internos de los vasos sanguíneos. (7.1)

Membrana plasmática: la membrana sirve como un enlace entre el interior de la célula y su ambiente extracelular. (4.1)

Membranas mitocondriales: membrana externa que sirve como unión con el citoplasma y es relativamente permeable; las membranas internas guardan la maquinaria respiratoria en sus múltiples invaginaciones y es muy impermeable. (5.1)

Metabolismo: el de las reacciones químicas que ocurren dentro de una célula. (3.3)

Metafase: estado de la mitosis durante el cual todos los cromosomas se alinean en el ecuador del huso cromático, con una cromátide de cada cromosoma conectada a un polo y su cromátide hija al polo opuesto. (14.2)

Metaloproteinasas de la matriz: familia de proteasas que contienen cinc y actúan en el espacio extracelular para digerir diferentes proteínas extracelulares y proteoglucanos. (7.1)

Metástasis: propagación de células cancerosas desde un tumor primario hasta sitios distantes en el cuerpo, donde puede iniciarse la formación de tumores secundarios. (16.3)

Metilación del DNA: proceso epigenético en el cual los grupos metilo se agregan a los residuos citosina en el DNA por medio de metiltransferasas de DNA. En vertebrados, la metilación del DNA ocurre en ciertos residuos CpG en las regiones promotoras de los genes y se relaciona con la inactivación de la expresión de genes. También se vincula de manera más amplia con la prevención de la transposición de los elementos genéticos móviles. (12.4)

Microfibrillas: haces de moléculas de celulosa que confieren rigidez a la pared celular y oponen resistencia a las fuerzas de empuje. (7.6)

Microfilamentos: estructuras citoesqueléticas sólidas de 8 nm de grosor compuestas por un polímero de doble hélice de la proteína de actina. Juegan un papel clave en todos los tipos de contractilidad y motilidad dentro de la célula. (9, 9.5)

Micrómetro: medida de longitud que equivale a 10^{-6} m. (1.3)

Microordenamientos de DNA: aquellos que se elaboran al colocar gotas con secuencias de DNA de diferentes genes en coordenadas conocidas en una superficie de vidrio. El portaobjetos de vidrio se incuba entonces con cDNA marcado con fluorescencia, cuyo nivel de hibridación provee una medida del nivel de expresión de cada gen en el microordenamiento. (12.4, 16.3)

Micro-RNA (miRNA): pequeños RNA (20 a 23 nucleótidos de largo) que se sintetizan en muchos sitios del genoma y cuyas funciones aún se comprenden poco. Se piensa que intervienen en la inhibición de la traducción de mRNA complementarios, la heterocromatización y el silenciado de la expresión génica. (11.5)

Microscopia de barrido confocal: técnica de microscopia en la que se utiliza un microscopio confocal, en esta técnica un rayo láser fino enfocado ilumina el espécimen con rapidez y penetra a través de él a una sola profundidad; de esa forma se ilumina sólo un plano delgado (o "sección óptica") dentro del objeto. Por lo general, el microscopio se utiliza con especímenes teñidos con fluorescencia y la luz emitida por la sección óptica iluminada se emplea para formar una imagen de la sección en una pantalla de video. (17.1)

Microscopia electrónica de transmisión TEM: área de la microscopia en donde se utilizan microscopios, que forman imágenes a partir de electrones que se transmiten a través de un espécimen. (18.2)

Microscopio: instrumento que genera una imagen amplificada de un objeto diminuto. (1.1)

Microscopio confocal de barrido láser: instrumento capaz de producir una imagen de un plano óptico delgado dentro de un espécimen mucho más grueso. (18.1)

Microscopio de campo brillante: instrumento en el cual la luz de la fuente de iluminación converge en el espécimen por medio del condensador, de tal modo que se forma un cono de luz brillante que puede pasar a través de la lente del objetivo. (18.1)

Microscopio de contraste de fase: instrumento que convierte diferencias del índice de refracción en diferencias de la intensidad (brillantez relativa y oscuridad), que son visibles para el ojo, lo cual hace a los objetos transparentes más visibles. (18.1)

Microscopio de fuerza atómica (AFM): instrumento de barrido de alta resolución cada vez más importante en nanotecnología y biología molecular. El AFM barre la superficie del espécimen con una delicada sonda. (18.3)
Microsomas: colección heterogénea de vesículas formadas a partir del sistema endomembranoso (de manera primaria el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi) después de la homogeneización. (8.2)
Microtúbulos: estructuras citoesqueléticas cilíndricas, de 25 nm de diámetro, cuya pared se compone de la proteína tubulina. Los microtúbulos son polímeros ensamblados de heterodímeros alfa-beta de tubulina dispuestos en hileras, o protofilamentos. Debido a su rigidez, los microtúbulos actúan a menudo en la capacidad de andamiaje. (9.3)
Miofibrillas: fibras delgadas y cilíndricas que forman las fibras musculares. Cada miofibrilla se compone de ordenamientos repetidos lineales de unidades contráctiles, llamadas **sarcómeras**, que confieren al músculo esquelético su apariencia estriada. (9.6)
Miosina: gran familia de proteínas motoras que se mueven a lo largo de los microfilamentos que contienen actina. Casi todas las miosinas son motores dirigidos hacia el extremo positivo. La **miosina convencional** (**miosina II**) es la proteína que media la contractilidad muscular, así como ciertos tipos de motilidad no muscular, por ejemplo, la citocinesis. Las miosinas no convencionales (I y III-XVIII) tienen diversas funciones, incluido el transporte de organelos. (9.5)
Miosinas convencionales (o tipo II): familia de miosinas, identificadas inicialmente en tejido muscular, que son los principales motores para la contracción muscular pero también se encuentran en diversas células no musculares. Las miosinas tipo II son necesarias para dividir una célula en dos durante la división celular, generar tensión en las adhesiones focales y cambiar el comportamiento de los conos de crecimiento. (9.5)
Miosinas no convencionales (Véase Miosina.)
Mitocondria: organelo celular en el cual se realiza la transformación de la energía aeróbica al oxidarse los intermediarios metabólicos como el piruvato que producen ATP. (5.1)
Mitosis: proceso de división nuclear en el cual los cromosomas duplicados se separan entre sí y producen dos núcleos, cada uno con una copia completa de todos los cromosomas presentes en la célula original. (14.2)
Modelo del mosaico líquido: modelo que presenta membranas como estructuras dinámicas en las cuales lípidos y proteínas son móviles y capaces de tener movimiento dentro de la membrana para interactuar con otras moléculas de la membrana. (4.2)
Modelos animales: animales de laboratorio que poseen características de alguna enfermedad humana particular. (PH2)
Modificaciones postraduccionales (PTM): cambios en las cadenas laterales de los 20 aminoácidos después de su incorporación en una cadena polipeptídica. (2.5)
Modulación alostérica: modificación de la actividad de una enzima a través de la interacción con un compuesto que se une a un sitio (p. ej., el sitio alostérico) diferente del punto activo. (3.3)
Moléculas apolares: moléculas con una distribución simétrica de cargas debido a que los componentes atómicos tienen más o menos las mismas electronegatividades. (2.1)
Moléculas del MHC: proteínas codificadas por la región MHC del genoma que unen antígenos procesados (péptidos antigénicos) y los presentan en la superficie de la célula. Se dividen en dos clases principales, **moléculas MHC de clase I**, que producen casi todas las células del cuerpo, y **moléculas MHC de clase II**, liberadas por células presentadoras de antígeno (APC) "profesionales", como macrófagos y células dendríticas. (17.4)
Moléculas mensajeras extracelulares: el medio por el cual las células suelen comunicarse entre sí. Los mensajeros extracelulares pueden viajar una corta distancia para estimular células en estrecha proximidad con el origen del mensaje, o viajar por todo el cuerpo, y potencialmente estimular células muy distantes de la fuente. (15.1)
Moléculas polares: moléculas con una distribución diferente de carga porque los átomos componentes tienen distintas electronegatividades. (2.1)
Monosomía: cromosoma complementario que pierde un cromosoma; por ejemplo, que tenga sólo un miembro de uno de los pares de cromosomas homólogos. (PH14)
Montaje completo: un espécimen observado con un microscopio óptico que es un objeto intacto, ya sea vivo o muerto; puede tratarse de un organismo intacto entero o de pequeñas partes de un organismo completo. (18.1)
Motivo: subestructura hallada entre muchas proteínas diferentes, como las de barril alfa-beta, que poseen cadenas beta conectadas por una región de hélice alfa. (2.5)
Mundo de RNA: estado propuesto de la evolución temprana de la vida, antes de la aparición del DNA y las proteínas, en el cual las moléculas de RNA sirvieron como material genético y de catálisis. (11.4)
Mutación: cambio espontáneo en un gen que altera a éste en forma permanente de tal manera que induce un cambio hereditario. (10.1)
Mutaciones en marco de lectura: mutaciones en las cuales un solo par de bases se agrega o desaparece del DNA; el resultado es un marco de lectura incorrecto a partir del punto de mutación a través del resto de la secuencia codificante. (11.8)
Mutaciones sensibles a la temperatura: mutaciones que se expresan solamente de manera fenotípica cuando las células (o los organismos) se cultivan a altas temperaturas (restrictivas). En las temperaturas bajas (permisivas), la proteína codificada es capaz de sostener y llevar a cabo su actividad, lo que lleva a un fenotipo normal. Las mutaciones sensibles a la temperatura son en particular útiles para estudiar las actividades requeridas, como la secreción y replicación, debido a que las mutaciones "ordinarias" que afectan a estos procesos son casi siempre letales. (8.2, 13.1)
Mutaciones sin sentido: alteraciones en el genoma que producen codones de paro dentro de los genes; de esa forma dan lugar a la terminación prematura de una cadena polipeptídica codificada. (11.8)
Mutagénesis dirigida al sitio: técnica de investigación que modifica un gen por medio de una vía predeterminada para producir una proteína con un aminoácido específico alterado. (18.18)
Mutante: individuo que tiene una característica heredable que lo distingue del tipo silvestre. (10.1)

Nanómetro: medida de longitud que es igual a 10^{-9} m. (1.3)
Nanotecnología: campo de la ingeniería mecánica que trata sobre el desarrollo de diminutas "nanomáquinas" capaces de realizar actividades específicas en un mundo submicroscópico. (9.1)
Neurofilamentos: haces laxamente empacados de filamentos intermedios localizados dentro del citoplasma de las neuronas. Los neurofilamentos tienen largos ejes que se orientan paralelos al del axón de las células nerviosas y están formados por tres proteínas distintas: NF-L, NF-H y NF-M. (9.4)
Neurotransmisor: sustancia química que se libera a partir de la terminal presináptica y que se une al blanco celular postsináptico, lo que altera el potencial de membrana de una célula blanco. (4.8)
Núcleo: organelo que contiene el material genético de una célula eucariota. (1.3)
Nucleoide: la región no muy bien definida de una célula procariota que contiene su material genético. (1.3)
Nucleolo: estructura nuclear de forma irregular que funciona como organelo que produce ribosomas. (11.3)

Nucleosomas: subunidades repetidas de DNA e histonas. Cada nucleosoma contiene una partícula nuclear del nucleosoma, que posee 146 pares de bases de DNA superenrollado dos veces alrededor del complejo en forma de disco de ocho histonas moleculares. Las partículas del núcleo del nucleosoma están conectadas la una con la otra por medio de un DNA de unión. (12.1)

Nucleótido: el monómero de ácido nucleico integrado por tres partes: un azúcar (ribosa o desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada, con el fosfato unido al azúcar en la posición 59 del carbono y a la base en la posición 19 del carbono. (2.5, 10.3)

Número de recambio: el máximo número de moléculas de sustrato que pueden convertirse en un producto por medio de una molécula enzimática por unidad de tiempo. (3.2)

Oligosacáridos: cadenas pequeñas formadas por azúcares unidos de manera covalente a lípidos y proteínas; permiten distinguir un tipo de célula de otro y ayudan a mediar las interacciones de una célula con sus alrededores. (2.5)

Oncogenes: genes codificadores de proteínas que promueven la pérdida de control de crecimiento y la conversión de una célula a un estado maligno. Estos genes tienen la capacidad de transformar a las células. (16.3)

Operador: sitio de unión para represores bacterianos ubicados entre el sitio de unión a la polimerasa y el primer gen estructural. (12.2)

Operón: complejo funcional en un cromosoma bacteriano que comprende un grupo de genes que incluye genes estructurales, una región promotora, una región operadora y un gen de regulación. (12.2)

Operón inducible: operón en el cual la presencia de una sustancia metabólica clave induce la transcripción del gen estructural. (12.2)

Organelos: estructuras intracelulares de las células eucariotas con características definidas que tienen organización y función diversas; son membranosas o están unidas a las membranas. (1.3)

Organismos modelo: organismos utilizados con amplitud por los investigadores de tal forma que se conoce mucho acerca de su biología. Estos organismos tienen propiedades que los hacen excelentes sujetos de investigación. Tales organismos incluyen la bacteria *E. coli*, la levadura *S. cerevisiae*, el nematodo *C. elegans*, la mosca de la fruta *D. melanogaster*, la planta de la mostaza *A. thaliana*, y el ratón *M. musculus.* (1.3)

Origen de duplicación: sitio específico del cromosoma bacteriano en que se inicia la duplicación. (13.1)

Ósmosis: la propiedad del agua de pasar a través de una membrana semipermeable de una región de baja concentración de solutos a otra de gran concentración, con la tendencia a que las concentraciones de solutos en los dos compartimientos se igualen al final. (4.7)

Oxidación: proceso a través del cual un átomo pierde uno o más electrones que dona a otro átomo; el átomo que gana electrones se considera reducido. (3.3)

P680: reacción central del fotosistema II. La "P" se refiere al pigmento y "680" es la longitud de onda de luz que esta molécula absorbe más fuertemente. (6.4)

P700: reacción central del fotosistema I. La "P" alude al pigmento y "700" es la longitud de onda de luz que esta molécula absorbe con mayor fuerza. (6.4)

Pared celular: estructura rígida e inerte que provee el andamiaje y la protección a la célula. (7.6)

Paredes primarias: paredes de una célula de planta en crecimiento. Permiten la extensibilidad. (7.6)

Paredes secundarias: son las paredes celulares gruesas de las células de plantas maduras. (7.6)

Partícula de reconocimiento de señal: partícula que posee seis distintos polipéptidos y una molécula pequeña de RNA llamada RNA 7S, que reconoce la secuencia de señal conforme emerge del ribosoma. La partícula de reconocimiento de señal se une a la secuencia de señal y luego a una membrana del retículo endoplásmico. (8.3)

Patógeno: cualquier agente capaz de causar infección o enfermedad en una célula u organismo. (2.5)

Pectinas: clase heterogénea de polisacáridos con carga negativa que constituyen la matriz de la pared celular vegetal. Las pectinas retienen agua y forman un gel que llena los espacios entre los elementos fibrosos. (7.6)

Peptidiltransferasa: porción de la unidad ribosómica grande que es responsable de catalizar la formación de enlaces peptídicos; la peptidiltransferasa reside activamente en la molécula de RNA ribosómico grande. (11.8)

Periodo refractario: breve periodo que sigue al final de un potencial de acción; durante él una célula excitable no puede reestimularse por arriba del umbral. (4.8)

Peroxisomas (microcuerpos): organelos simples del citoplasma, multifuncionales y unidos a la membrana, que llevan a cabo diversos ordenamientos de reacciones metabólicas, entre ellos la oxidación del sustrato que desemboca en la formación de peróxido de hidrógeno. Por ejemplo, los peroxisomas son el sitio de oxidación de cadenas muy largas de ácidos grasos y de la oxidación del ácido úrico y la síntesis de plasmalógenos. Los glioxisomas de las plantas, que efectúan el ciclo del glioxilato, son un tipo de peroxisomas. (5.6)

pH: medida estándar de la acidez relativa, que en términos matemáticos es igual a $-\log[H^+]$. (2.3)

Pigmentos: moléculas que poseen un cromóforo, es decir, un grupo químico capaz de absorber luz de una longitud de onda particular del espectro visible. (6.3)

Pinza β: uno de los componentes no catalíticos del replisoma que rodea al DNA y mantiene la polimerasa en contacto con la plantilla de DNA. (13.1)

Pinza deslizante: proteína en forma de anillo que desempeña una función de importancia en la replicación del DNA al tomar este DNA y aproximarlo a la polimerasa que replica el DNA. (13.1)

Pirimidina: una clase de base nitrogenada hallada en los nucleótidos con una estructura de anillo único, incluidas **citosina** y **timidina**, las cuales se encuentran en el DNA, y citosina y **uracilo**, que se hallan en el RNA. (2.5, 10.3)

Placa celular: estructura formada entre el citoplasma de dos células hijas recién formadas para dar lugar a una nueva pared celular en las células vegetales. (7.6, 14.3)

Plantas C_3: plantas que dependen sólo de la vía C_3 para fijar CO_2 atmosférico. (6.6)

Plantas C_4: plantas, sobre todo pastos tropicales, que emplean la vía de fijación de carbón C_4. (6.6)

Plantas CAM: aquellas que utilizan carboxilasa de PVE en la fijación de CO_2, tal y como lo hacen las plantas C4, pero llevan a cabo las reacciones dependientes de luz y la fijación de carbono en diferentes momentos del día, así que los estomas pueden cerrarse durante las horas más importantes para la pérdida de agua. (6.6)

Plantilla o molde: cadena individual de DNA (o RNA) que contiene la información (codificada como una secuencia de nucleótidos) para construir una cadena complementaria. (13.1)

Plasmodesmas: canales citoplásmicos cilíndricos, de 30 a 60 nm de diámetro, que conectan a la mayoría de las células de plantas y se extienden entre células adyacentes directamente a través de la pared celular. Los plasmodesmas están alineados con la membrana plasmática y por lo general contienen una partícula central densa; el desmotúbulo, derivado del retículo endoplásmico de dos células. (7.5)

Plasmólisis: encogimiento que ocurre cuando una célula vegetal se coloca en un medio hipertónico; su volumen disminuye a medida que la membrana

plasmática se retrae alejándose de la pared celular circundante. (4.7)

Plegamiento: se dice que los dominios que se agrupan en la misma familia y que tienen un esqueleto que se pliega aproximadamente en la misma configuración comparten un plegamiento común. (2.5)

Polimerasa de RNA I: enzima de transcripción encontrada en las células eucariotas que sintetiza un RNA ribosomal grande (28S, 18S y 5.8S). (11.3)

Polimerasa de RNA II: enzima de transcripción hallada en células eucariotas que sintetiza los RNA mensajeros y la mayoría de los RNA pequeños nucleares. (11.4)

Polimerasa de RNA III: enzima de transcripción encontrada en células eucariotas que sintetiza diferentes RNA de transferencia y el RNA ribosomal 5S. (11.3)

Polimerasas de DNA: enzimas encargadas de la formación de nuevas cadenas de DNA durante la replicación o la reparación del DNA. (13.1)

Polimerasas de RNA dependientes de DNA (polimerasas de RNA): enzimas cuya función es la transcripción en células procariotas y eucariotas. (11.2)

Polimorfismo genético: sitios del genoma que varían con gran frecuencia entre diferentes individuos en las poblaciones de una especie. (PH10)

Polimorfismos de un solo nucleótido: sitios del genoma donde las bases alternas se encuentran con gran frecuencia en la población. Los polimorfismos de un solo nucleótido son excelentes marcadores genéticos para los estudios de mapeo en el genoma. (10.6)

Poliploidización (duplicación del genoma por completo): fenómeno en el cual los descendientes tienen dos veces el número de cromosomas en cada célula respecto de sus progenitores diploides. Puede ser un paso importante en la evolución de nuevas especies. (10.5)

Polirribosoma (polisoma): complejo formado por un mRNA y diferentes ribosomas en el proceso de traducción del mRNA. (11.8)

Polisacárido: polímero de unidades azúcar unidas por enlaces glucosídicos. (2.5)

Porinas: proteínas integrales encontradas en las mitocondrias y cloroplastos de la membrana externa que actúan como canales grandes no selectivos. (5.1)

Potencial de acción: cambios generales del potencial de membrana, que comienzan con la despolarización y terminan con el retorno al potencial de reposo, se efectúan con la estimulación de una célula excitable y actúan como la base de la comunicación neuronal. (4.8)

Potencial de membrana: la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana. (4.8)

Potencial de oxidorreducción (redox): la separación de carga, medida en voltaje, de cualquier par de agentes oxidorreductivos, como NAD^+ y NADH, en relación con un estándar (p. ej., H^+ y H_2). (5.3)

Potencial de reposo: la diferencia de potencial eléctrico medida en una célula excitable cuando no está sujeta a estimulación externa. (4.8)

Potencial de transferencia: medida de la capacidad de una molécula para transferir cualquier grupo a otra molécula; las moléculas que tienen una gran afinidad por el grupo son los mejores aceptores y las moléculas con baja afinidad los mejores donantes. (3.3)

Potencial de transferencia de electrones: afinidad relativa por los electrones, como la que tiene un compuesto de baja afinidad con un potencial elevado para transferir uno o más electrones en una reacción de oxidorreducción (y que actúa como un agente reductor). (5.3)

Pre-RNA: molécula de RNA que no se ha procesado a su forma madura final (p. ej., pre-mRNA, pre-rRNA o pre-tRNA). (11.4)

Presión de turgencia: presión hidrostática que se crea en una célula vegetal debido al estado hipertónico del compartimiento intracelular. La presión de turgencia se ejerce contra la pared celular circundante y provee un apoyo al tejido de la planta. (4.7)

Primasa: tipo de polimerasa de RNA que ensambla los iniciadores de RNA cortos que comienzan la síntesis de cada uno de los fragmentos de Okazaki de la cadena retrasada. (13.1)

Primera ley de la termodinámica: la ley de la conservación de la energía, según la cual los estados de la energía no pueden ni crearse ni destruirse. (3.1)

Prión: agente infeccioso relacionado con ciertas enfermedades degenerativas de mamíferos compuesto sólo de proteínas. (PH2)

Procesivo: término aplicado a las proteínas (p. ej., cinesina o polimerasa de RNA) que son capaces de moverse a distancias considerables a lo largo de su trayecto o molde (p. ej., microtúbulo o molécula de DNA) sin disociarse de él. (9.3, 11.2)

Profase: primer estado de la mitosis durante la cual los cromosomas duplicados se preparan por segregación y la maquinaria mitótica se ensambla. (14.2)

Prometafase: fase de la mitosis durante la cual se forma el huso mitótico definitivo y los cromosomas se mueven a una posición central de la célula. (14.2)

Promotor: sitio en el DNA en el que una molécula de polimerasa de RNA se une antes de iniciar la transcripción. El promotor contiene información que determina cuál de las dos cadenas de DNA se transcribe y el sitio en el cual comienza la transcripción. (11.2, 12.2)

Proteína conjugada: proteína unida de manera covalente o no covalente a otras sustancias además de los aminoácidos, tales como metales, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos. (2.5)

Proteína de fijación de lípidos: proteína relacionada con la membrana ubicada fuera de la bicapa, pero unida de forma covalente a una molécula lipídica dentro de la bicapa. (4.4)

Proteína fibrosa: proteína con estructura terciaria que se elonga en sumo grado, de tal modo que semeja una fibra. (2.5)

Proteína fluorescente verde: proteína fluorescente que codifica la medusa *Aequoria victoria* y que se usa en extenso para estudiar los sucesos de las células vivas. En la mayoría de los casos el gen que codifica a esta proteína se fusiona con el gen de interés, y el DNA que contiene las proteínas de fusión se introduce dentro de las células bajo estudio. (8.2)

Proteína G: véase proteína de unión a GTP.

Proteína G heterotrimérica: componente de ciertos sistemas de señalización, referidos como proteínas G debido a que unen nucleótidos de guanina (GDP o GTP); se describen como heterotriméricos porque todos sus integrantes poseen tres diferentes subunidades de polipéptidos. (15.3)

Proteína globular: proteína con una estructura terciaria que es compacta y semeja un globo. (2.5)

Proteína integral: proteína relacionada con la membrana que penetra o atraviesa la bicapa lipídica. (4.4)

Proteína motora: aquella proteína que utiliza la energía de la hidrólisis del ATP para generar fuerzas mecánicas para el movimiento de proteínas y unir cargamentos a lo largo de uno de los componentes del citoesqueleto. Se conocen tres familias de proteínas motoras: cinesinas y dineínas que se mueven por los microtúbulos y miosinas que lo hacen por los microfilamentos. (9.3)

Proteína naciente: proteína en el proceso de sintetizarse, por ejemplo, la que no está completa aún. (11.8)

Proteína periférica: proteína relacionada con membranas que se halla fuera de la bicapa lipídica e interactúa a través de enlaces no covalentes. (4.4)

Proteína reguladora de genes: proteína capaz de reconocer una secuencia específica de pares de bases dentro del DNA y unirse a la secuencia con alta afinidad de tal modo que se altera la expresión de los genes. (12.3)

Proteínas: grupos diversos, en los sentidos estructural y funcional, de polímeros

construidos de monómeros de aminoácidos. (2.5)

Proteínas activadoras de GTPasa: proteínas que se unen a las proteínas G, con lo cual activan su actividad de GTPasa. Como resultado, las proteínas activadoras de GTPasa acortan la duración de la respuesta mediada por proteínas G. (15.4)

Proteínas de fijación a GPI: proteínas periféricas de membrana fijadas a la membrana por medio de una molécula de glucofosfatidilinositol de la bicapa. (4.4)

Proteínas de hierro-azufre: grupo de proteínas portadoras de electrones con un centro inorgánico de hierro-azufre. (5.3)

Proteínas de unión a actina: cualesquiera de las casi 100 proteínas pertenecientes a diferentes familias que afectan el ensamble de los filamentos de actina, sus propiedades físicas y su interacción entre sí y con los organelos celulares. (9.7)

Proteínas de unión a calcio: proteínas, como la calmodulina, que unen calcio y permiten que el calcio participe en gran variedad de respuestas celulares. (15.5)

Proteínas de unión a DNA de cadena sencilla: proteínas que facilitan la separación de las cadenas de DNA por medio de su unión a DNA de cadena sencilla; ello las mantiene en un estado extendido e impide su revinculación. (13.1)

Proteínas de unión a GTP (o proteínas G): con funciones reguladoras clave en muchos procesos celulares distintos, las proteínas G pueden existir cuando menos en dos conformaciones alternativas, una forma activa unida a una molécula de GTP, y una forma inactiva unida a una molécula de GDP. (8.3)

Proteínas que transfieren fosfolípidos: proteínas cuya función es transportar fosfolípidos específicos a través del citosol acuoso de un tipo de compartimiento membranoso a otro. (8.3)

Proteínas relacionadas con microtúbulos (MAP): proteínas que son parte de las tubulinas contenidas en los microtúbulos obtenidos de las células. Las MAP pueden interconectar microtúbulos para formar asas o ramilletes, y observarse como puentes cruzados que conectan microtúbulos entre sí. Otras MAP pueden incrementar la estabilidad de los microtúbulos, alterar su rigidez o modificar la velocidad de su ensamble. (9.3)

Proteintirosincinasa: enzima que fosforila residuos de tirosina específicos de otras proteínas. (15.4)

Proteintirosincinasas receptoras (o RTK): receptores de superficie celular capaces de fosforilar residuos tirosina por sí solos, en sustratos citoplásmicos, o ambas cosas. Intervienen principalmente en el control de la proliferación y la diferenciación celulares. (15.4)

Proteoglucano: complejo polisacárido-proteína integrado por un núcleo de proteínas al que se agregan cadenas de glucosaminoglucanos. Debido a la naturaleza acídica de los glucosaminoglucanos, los proteoglucanos son capaces de construir gran número de cationes, los cuales atraen gran cantidad de moléculas de agua. Como resultado, los proteoglucanos forman un gel hidratado y poroso que actúa como un material de "empaquetamiento" para resistir la compresión. (7.1)

Proteoma: inventario completo de proteínas de un organismo particular, tipo celular u organelo. (2.5)

Proteómica: campo emergente de la bioquímica de las proteínas que realiza estudios a gran escala en diversas mezclas de proteínas. (2.5)

Proteosoma: complejo multiproteínico en forma de barril en el que las proteínas citoplásmicas se degradan. Las proteínas seleccionadas para destrucción se unen a las moléculas de ubiquitina y se transfieren a la cámara central del proteosoma. (12.7)

Protofilamentos: subunidades globulares de ordenamientos longitudinales de un microtúbulo que están alineadas de forma paralela al eje del túbulo. (9.3)

Protooncogenes: variedad de genes que tienen el potencial de cambiar las actividades propias de las células y derivarlas a los estados malignos. Los protooncogenes codifican proteínas que tienen distintas funciones en la célula normal. Pueden convertirse en oncogenes. (16.3)

Protoplasto: célula desnuda de planta a cuya pared celular la ha digerido la enzima celulasa. (18.5)

Protoplastos: precursores no pigmentados de cloroplastos. (6.1)

Provirus: término utilizado para un DNA vírico cuando éste se ha integrado al cromosoma de una célula hospedadora. (1.4)

Puente de hidrógeno: aquel que tiene una débil interacción por atracción entre un átomo de hidrógeno unido de forma covalente a un átomo electronegativo (con una carga parcial positiva) y un segundo átomo electronegativo. (2.2)

Puente disulfuro: se forma entre dos cisteínas que están distantes entre sí en el esqueleto polipeptídico o en dos polipéptidos separados. Ayudan a estabilizar las intrincadas formas de las proteínas. (2.5)

Punto de control: mecanismo que detiene el progreso del ciclo celular si: a) cualquier DNA cromosómico se daña o b) ciertos procesos críticos, como la replicación del DNA o el alineamiento de los cromosomas durante la mitosis, no se completan de modo apropiado. (14.1)

Punto de revisión del huso: punto de revisión que opera en la transición entre metafase y anafase; se observa mejor cuando un cromosoma no puede alinearse correctamente en la placa de metafase. (14.2)

Punto isoeléctrico: valor del pH en el cual las cargas negativas del componente aminoacídico de una proteína igualan las cargas positivas, de manera que la proteína tiene un valor neutral. (18.7)

Purina: una clase de base nitrogenada encontrada en los nucleótidos con estructura de doble anillo, incluidas **adenina** y **guanina**, que se encuentran en el DNA y RNA. (2.5, 10.3)

Quiasma: puntos específicos de la unión entre los cromosomas homólogos bivalentes, observados a medida que los cromosomas homólogos se mueven en el inicio del estado de diploteno de la profase meiótica 1. Por lo general, los quiasmas se ubican en el sitio del cromosoma en el cual ocurre de modo previo el intercambio genético durante el entrecruzamiento. (14.3)

Quimioautótrofo: es un autótrofo que emplea la energía almacenada en moléculas inorgánicas (p. ej., amonio, sulfito de hidrógeno o nitritos) para convertir CO_2 en compuestos orgánicos. (6)

Quimioósmosis: mecanismo para la síntesis de ATP en que el movimiento de los electrones a través de las cadenas transportadoras de electrones resulta en el establecimiento de un gradiente de protones por medio de la membrana interna mitocondrial; el gradiente actúa como un intermediario de alta energía y relaciona la oxidación de los sustratos con la fosforilación del ADP. (VE5)

Rabs: familia de proteínas G monoméricas que participan en el tráfico de vesículas. (8.5)

Radicales libres: átomos o moléculas sumamente reactivos que contienen un solo electrón no pareado. (PH2)

Ran: proteína de unión a GTP que existe en forma activa, unida a GTP, o inactiva, unida a GDP. Regula el transporte nucleoplásmico. (12.1)

rDNA: secuencias de DNA codificadoras de rRNA que habitualmente están repetidas cientos de veces y de manera característica se agrupan en una o pocas regiones del genoma. (11.3)

Reacción al choque térmico: activación de la expresión de un ordenamiento de diversos genes, en respuesta a la elevación de la temperatura. Entre los productos de estos genes figuran las chaperonas moleculares, que ayudan al organismo a recobrarse de los efectos

dañinos de la temperatura elevada. (VE2)

Reacción de oxidorreducción (redox): reacción en la cual sucede un cambio en el estado electrónico de los reactantes. (3.3)

Reacción en cadena de la polimerasa: técnica en la cual una sola región del DNA, que puede estar presente en diferentes cantidades, puede amplificarse con precisión y rapidez. (18.14)

Reacción inmunitaria: respuesta generada por las células del sistema inmunitario en contacto con materiales extraños, entre ellos los patógenos invasores. Incluye las respuestas innatas y adquiridas. Las reacciones inmunitarias adquiridas pueden dividirse en respuestas primarias, que siguen a la exposición inicial a un antígeno, y respuestas secundarias, que aparecen después de una nueva exposición a ese antígeno. (17.1)

Reacción inmunitaria adaptativa: respuesta específica a un patógeno que exige la exposición previa a ese agente; incluye las respuestas mediadas por anticuerpos y linfocitos T. (17)

Reacción inmunitaria innata: aquella respuesta inespecífica a un patógeno que no requiere la exposición previa a este agente, incluida la respuesta mediada por células asesinas naturales, complemento, fagocitosis e interferón. (17.1)

Reacciones dependientes de la luz: primera de dos series de reacciones que componen la fotosíntesis. En estas reacciones, la energía de la luz solar se absorbe y convierte a energía química, que se almacena en ATP y NADPH. (6.2)

Reacciones endergónicas: reacciones que no son favorables desde el punto de vista termodinámico y no pueden ocurrir de manera espontánea; poseen un valor $+\Delta G$. (3.1)

Reacciones endotérmicas: las que experimentan ganancia de calor bajo condiciones constantes de presión y volumen. (3.1)

Reacciones espontáneas: reacciones que son favorables desde el punto de vista termodinámico y que ocurren sin ninguna entrada de energía externa. (3.1)

Reacciones exergónicas: reacciones que son favorables en sentido termodinámico y poseen un valor $-\Delta G$. (3.1)

Reacciones exotérmicas: reacciones que liberan calor bajo condiciones de presión y volumen constantes. (3.1)

Reacciones independientes de la luz: segunda de las dos series de reacciones que componen la fotosíntesis. En éstas, los carbohidratos se sintetizan a partir del dióxido de carbono mediante la energía almacenada en el ATP y NADPH formados en las reacciones de la luz. (6.2)

Recambio: destrucción de materiales celulares y su remplazo. (8.7)

Receptor: cualquier sustancia que pueda unirse a una molécula específica (ligando); a menudo lleva a la captación o transducción de señal. (4.1, 15.1)

Receptor de células T: proteínas halladas en la superficie de los linfocitos T que median la interacción con células específicas que unen antígenos. Como la inmunoglobulina de las células B, estas proteínas se forman a partir de un proceso de reordenamiento del DNA que genera un sitio de combinación antigénico específico. El receptor de células T posee dos subunidades, cada una con dos dominios, uno variable y otro constante. (17.3)

Receptor de SRP: situado dentro de la membrana del ER, el receptor de SRP se une específicamente al complejo SRP-ribosoma. (8.3)

Receptores acoplados a proteínas G: grupo de receptores relacionados que cruzan la membrana plasmática siete veces. La unión del ligando al receptor específico causa un cambio en la conformación del receptor que incrementa su afinidad por la proteína G e inicia una respuesta dentro de la célula. (15.3)

Receptores tipo Toll (TLR): tipo de receptor de agentes patógenos. El ser humano expresa cuando menos 10 TLR funcionales, todos ellos proteínas transmembrana presentes en las superficies de muchos tipos distintos de células. (17.1)

Recombinación genética (entrecruzamiento): intercambio de los genes en cromosomas (de tal forma que se altera el ligamento de grupos) como resultado de la rotura y reunión de segmentos de cromosomas homólogos. (10.6)

Recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueamiento: técnica para estudiar el movimiento de los componentes de la membrana que incluye tres etapas: a) unión de los componentes de la membrana a un colorante fluorescente, b) blanqueamiento irreversible (remoción de la fluorescencia visible) de una porción de la membrana, c) evaluación de la reaparición de la fluorescencia (debido al movimiento aleatorio de los componentes teñidos con fluorescencia de la parte externa del área blanqueada) en una porción blanqueada de la membrana. (4.6)

Red de Golgi *cis* (CGN): cara más *cis* del organelo constituido por la red interconectada de túbulos localizados en la cara de entrada más cerca del ER. Se piensa que la CGN funciona principalmente como una estación clasificadora que distingue entre proteínas que deberán reenviarse al ER y las que se permitirán que continúen hasta la siguiente estación de Golgi. (8.4)

Red de Golgi *trans*: red de elementos tubulares interconectados en el extremo *trans* del aparato de Golgi que segrega y ubica a las proteínas para llevarlas a su último destino celular o extracelular. (8.4)

Reducción: proceso a través del cual un átomo gana uno o más electrones de otro átomo; el átomo que pierde electrones se considera oxidado. (3.3)

Regiones constantes: hace referencia a las porciones ligera y pesada de un anticuerpo cuyas cadenas polipeptídicas tienen la misma secuencia aminoacídica. (17.4)

Regiones hipervariables: regiones variables de los anticuerpos que difieren de manera más significativa en secuencia de una molécula a otra y se relacionan con la especificidad de antígeno. (17.4)

Regiones no traducidas: segmentos no codificantes contenidos en los extremos 5′ y 3′ terminales de los mRNA. (12.6)

Regiones variables: porciones de las cadenas polipeptídicas de anticuerpos ligeras y pesadas que difieren en la secuencia aminoacídica de un anticuerpo específico a otro. (17.4)

Relación de área de superficie/volumen: proporción existente entre las dimensiones celulares que indica cómo una célula puede de forma efectiva intercambiar sustancias con su ambiente. (1.3)

Renaturalización: revinculación de cadenas complementarias sencillas de DNA de doble hélice desnaturalizadas de manera previa. (10.3)

Renaturalización (recocido): revinculación de moléculas de DNA monocatenario complementarias que habían sido desnaturalizadas. (10.4)

Reparación de la mala unión: sistema de reparación del DNA que remueve bases mal pareadas, que luego incorpora la polimerasa de DNA y que escapan de la enzima exonucleasa de lectura y corrección. (13.2)

Reparación por eliminación de bases (BER): mecanismo de corte y pegado para la eliminación de DNA de nucleótidos alterados, por ejemplo, el uracilo (formado a partir de la citosina) y 8-oxo-guanina. (13.2)

Reparación por eliminación de nucleótidos: mecanismo de corte y unión para remover del DNA diversas lesiones voluminosas, por ejemplo, dímeros de pirimidina formados por la radiación ultravioleta. (13.2)

Repeticiones en tándem: grupo en el cual una secuencia repetida continúa sin interrupción. (10.3)

Réplica: molde que se forma a partir de metal y carbón en la superficie de un tejido; se utiliza en microscopia electrónica. Las divergencias del grosor del metal en diferentes partes del molde

dan lugar a diversos números de electrones de penetración en cada vista del escrutinio. (18.2)

Replicación: duplicación del material genético. (13)

Represor: proteína reguladora de un gen que se une al DNA e inhibe la transcripción. (12.2)

Resolución: capacidad de ver dos puntos contiguos en un campo visual como entidades distintas. (18.1)

Respuesta a las proteínas no plegadas UPR: reacción que ocurre en las células cuyas cisternas del retículo endoplásmico contienen una concentración muy alta de proteínas no plegadas o mal plegadas. Los sensores que detectan lo anterior activan una vía que lleva a la síntesis de proteínas (p. ej., chaperonas moleculares) que pueden eliminar el estrés en el retículo endoplásmico. (8.3)

Retículo endoplásmico: sistema de túbulos, cisternas y vesículas que divide el contenido líquido del citoplasma en un espacio luminal dentro de la membrana del retículo endoplásmico y un espacio citosólico fuera de las membranas. (8.3)

Retículo endoplásmico liso (SER): parte del retículo endoplásmico libre de ribosomas. Los elementos membranosos del SER son casi siempre tubulares y forman un sistema interconectado de tubos a través del citoplasma en el cual se forman. Las funciones del SER varían de una célula a otra e incluyen la síntesis de hormonas esteroideas, destoxificación de una amplia variedad de compuestos orgánicos, movilización de glucosa a partir de la glucosa 6-fosfato y el secuestro de iones de calcio. (8.3)

Retículo endoplásmico rugoso (RER): parte del retículo endoplásmico que tiene ribosomas relacionados. El RER aparece como un organelo que se extiende a partir de la membrana y se compone de manera primaria de sacos aplanados (cisternas) separados por espacios citosólicos. Las funciones del RER incluyen la síntesis de proteínas de secreción, proteínas lisosomales, proteínas integrales de membrana y lípidos de membrana. (8.3)

Retículo sarcoplásmico: sistema de membranas citoplásmicas del retículo endoplásmico liso en las células musculares que forma un aparato membranoso alrededor de las miofibrillas. (9.6)

Retrotransposones: elementos transponibles que requieren la transcriptasa inversa para sus movimientos. (10.5)

Ribointerruptores: mRNA que, una vez unidos a un metabolito, experimentan un cambio en su conformación plegada que les permite modificar la expresión de un gen que participa en la producción de ese metabolito. La mayoría de los ribointerruptores suprimen la expresión génica bloqueando el fin de la transcripción o el inicio de la traducción. (12.3)

Ribozima: molécula de RNA que funciona como un catalítico en las reacciones celulares. (2.5)

RNA de interferencia (RNAi): fenómeno que ocurre de manera natural en el cual los RNA de doble cadena (dsRNA) llevan a la degradación de los mRNA que tienen propiedades idénticas. Los RNAi funcionan al parecer de manera primaria en el bloqueo de la replicación de los virus y la restricción del movimiento de los elementos transponibles; en ambos participa la formación de intermediarios de dsRNA. Las células de mamífero pueden elaborar un RNAi por medio del tratamiento de las células con RNA muy pequeños (21 nt). Estos pequeños RNA (siRNA) inducen la degradación de los mRNA que contienen la misma secuencia. (11.5)

RNA de interferencia pequeños (siRNA): fragmentos bicatenarios pequeños (21 a 23 nucleótidos) que se forman cuando el RNA bicatenario inicia la respuesta durante el silenciamiento por RNA. (11.5)

RNA de transferencia (tRNA): familia de RNA pequeños que traducen la información codificada en el "alfabeto" de nucleótidos de un mRNA dentro del "alfabeto" de aminoácidos de un polipéptido. (11.1)

RNA mensajero (mRNA): molécula intermedia entre un gen y el polipéptido al que codifica. El RNA mensajero se ensambla como una copia complementaria de una de las dos cadenas de DNA que codifica el gen. (11.1)

RNA nucleares heterogéneos (hnRNA): un gran grupo de moléculas de RNA que comparten las siguientes propiedades: a) tienen elevado peso molecular (hasta unos 80S, o 50 000 nucleótidos; b) representan muchas secuencias nucleotídicas distintas, y c) sólo se encuentran en el núcleo. Se incluyen los pre-mRNA. (11.4)

RNA nucleares pequeños (snRNA): RNA necesarios para el procesamiento de mRNA; son pequeños (90 a 300 nucleótidos de longitud) y funcionan en el núcleo. (11.4)

RNA nucleolares pequeños (snoRNA): RNA requeridos para la metilación y seudouridilación del pre-rRNA durante la formación del ribosoma en el nucleolo. (11.3)

RNA ribosómicos (rRNA): los RNA de un ribosoma. Los rRNA reconocen otras moléculas y se unen a ellas, dan soporte estructural y catalizan la reacción química en que los aminoácidos forman enlaces covalentes entre sí. (11.1)

Rotura de la envoltura nuclear: desensamble de la envoltura nuclear en el extremo de la profase. (14.2)

Roturas de la doble cadena: daño ocasionado al DNA casi siempre por la radiación ionizante y que interviene en la fractura de las dos cadenas de la doble hélice. Las roturas de la doble cadena pueden ser debilitantes en una célula y en su reparación participan por lo menos dos sistemas de reparación distintos. (13.2)

Sarcómeras: unidades contráctiles de miofibrillas matizadas con un patrón característico de bandas que confiere al músculo esquelético su aspecto estriado. (9.6)

Sección: corte muy delgado de tejido de una planta o animal. (18.1)

Secciones seriales: una serie de cortes sucesivos de un bloque de tejido. (18.1)

Secreción: liberación hacia afuera de la célula. (8.1)

Secreción constitutiva: liberación de materiales sintetizados en la célula en el espacio extracelular de una manera continua y no regulada. (8.1)

Secreción regulada: liberación de los materiales sintetizados en las células, almacenados en gránulos de secreción y rodeados de membrana en las regiones periféricas del citoplasma; ocurre como reacción a un estímulo apropiado. (8.1)

Secuencia de consenso: versión más común de una secuencia conservada. La secuencia TTGACA (conocida como elemento –35) es un ejemplo de secuencia de consenso. (11.2)

Secuencias conservadas: se refiere a las secuencias aminoacídicas de polipéptidos particulares o las secuencias nucleotídicas de ácidos nucleicos específicos. Si dos secuencias son similares, por ejemplo, homólogas, se dice que están conservadas, lo cual indica que no se separaron demasiado de una secuencia ancestral común a lo largo de la evolución. Se ha observado que las secuencias conservadas no son funcionales cuando existen sustituciones aminoacídicas o nucleotídicas. (2.4)

Secuencias interpuestas (intrones): regiones del DNA situadas entre las secuencias codificantes de un gen y que eliminan los mRNA correspondientes. (11.4)

Seguimiento de partícula individual (SPT): técnica para estudiar el movimiento de proteínas de membrana que consiste en dos pasos: a) unión de las moléculas de proteína a sustancias visibles, como partículas de oro coloidal y b) vigilancia de los movimientos de las partículas marcadas individuales bajo el microscopio. (4.6)

Segunda ley de la termodinámica: es el principio según en el cual todos los sucesos se mueven de un estado de mayor energía a otro de menor energía, y en este sentido son espontáneos. (3.1)

Segundo mensajero: sustancia que se libera en el interior de una célula como resultado de la unión de un primer mensajero (una hormona u otro ligando) al receptor de la superficie externa de la célula. (15.3)
Selectinas: familia de glucoproteínas integrales de membrana que reconocen y se unen a ordenamientos específicos de grupos de carbohidratos proyectados desde la superficie de otras células. (7.3)
Semiconservadora: replicación en la cual cada célula hija recibe una cadena de la hélice del DNA parental. (13.1)
Semipermeable: capacidad de las membranas de ser permeables del todo al agua y de modo parcial a pequeños iones y solutos polares. (4.7)
Señal de localización nuclear: secuencia de aminoácidos en una proteína que reconoce un receptor transportador y que lleva a la translocación de la proteína desde el núcleo hasta el citoplasma. (12.1)
Señal de peptidasa: enzima proteolítica que remueve la porción N-terminal, incluido el péptido de señal de un polipéptido naciente sintetizado en el RER. (8.3)
Señal de secuencia: series especiales de aminoácidos localizados en el extremo N-terminal de proteínas recién formadas que activan la unión de los ribosomas formadores de proteína a una membrana del retículo endoplásmico y el movimiento del polipéptido naciente dentro del espacio de la cisterna del retículo endoplásmico. (8.3)
Señalización celular: comunicación en la cual la información se libera a través de la membrana plasmática hacia el interior de la célula, y con frecuencia al núcleo celular por medio de interacciones moleculares. (15)
Señalización transmembranosa: transferencia de información a través de la membrana plasmática. (7.3, 15)
Seudogenes: secuencias que son claramente homólogas a los genes funcionales, pero han acumulado mutaciones que provocan que éstas no sean funcionales. (10.5)
Seudópodos: prolongaciones redondeadas y amplias formadas durante los movimientos ameboides; son porciones de la superficie de la célula que protruyen hacia la periferia por acción de columnas de citoplasma a través del interior celular. (9.7)
Silenciamiento por RNA: proceso en el cual el dsRNA induce la inhibición específica de secuencia de la expresión génica. (11.5)
Sinapsis: las uniones especializadas de una neurona con su célula blanco. (4.8)
Sináptico: proceso por medio del cual los homólogos se unen entre sí durante la meiosis. (14.3)
Síntesis translesional: replicación que salta una lesión en la cadena molde. La efectúa un grupo especial de polimerasas de DNA que no tienen la procesividad, capacidad para lectura y corrección, y alta fidelidad. (13.3)
Sintetasa ATP: la enzima de la membrana interna mitocondrial ATP-sintetasa, está integrada por dos estructuras: la pieza F1 y la pieza basal F_0, esta última embebida dentro de la membrana. (5.5)
Sintetasa de aminoacil-tRNA (AARS): enzima que une de forma covalente los aminoácidos a los extremos 3′ de los tRNA transportadores; una sintetasa de aminoacil-tRNA específica reconoce a cada aminoácido. (11.7)
Sistema de dos híbridos de levadura: técnica empleada para buscar interacciones proteína-proteína. Depende de la expresión de un gen indicador como (β)-galactosidasa, cuya actividad es vigilada fácilmente por una prueba que detecta un cambio de color cuando la enzima está presente en una población de células de levadura (18.7)
Sistema de endomembrana: un grupo de organelos citoplásmicos membranosos interrelacionados de manera funcional y estructural que incluye al retículo endoplásmico, aparato de Golgi, endosomas, lisosomas y vacuolas. (8)
Sistema inmunitario: sistema fisiológico integrado por órganos, tejidos y células independientes que protegen al cuerpo de patógenos invasores y materiales extraños. (17)
Sistema libre de células: sistema experimental para estudiar las actividades celulares que no requieren las células completas. Por lo general, estos sistemas contienen una preparación de proteínas purificadas o fracciones subcelulares y son manipulables con fines experimentales. (8.2)
Sitio A (aminoacilo): punto en el cual el aminoacil-tRNA entra al complejo ribosoma-mRNA. (11.8)
Sitio activo: parte de una molécula de enzima que interviene de forma directa en la unión del sustrato. (3.2)
Sitio P (peptidilo): sitio del ribosoma en el cual el tRNA dona los aminoácidos a la cadena polipeptídica en crecimiento. (11.8)
Sitios de *splicing*: los extremos 5′ y 3′ de cada intrón. (11.4)
SNARE: proteínas clave que median el proceso de fusión de membrana. Los **T-SNARE** se localizan en las membranas de compartimientos blanco. Las **V-SNARE** se incorporan en las membranas de vesículas de transporte durante la gemación. (8.5)
snRNP: partículas de ribonucleoproteínas distintas contenidas en los espliceosomas; se denominan de ese modo debido a que se componen de snRNA unidos a proteínas específicas. (11.4)
sonRNP (ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas): partículas que se forman cuando se empacan snoRNA con proteínas específicas; las snoRNP participan en la maduración y el ensamblaje de ENA ribosómicos. (11.3)
***Splicing* alternativo:** mecanismo ampliamente distribuido por medio del cual un gen puede codificar dos o más proteínas relacionadas. (12.5)
***Splicing* de RNA:** proceso de remoción de las secuencias interpuestas de DNA (intrones) de un transcrito primario. (11.4)
Subunidad: una cadena polipeptídica que se relaciona con una o más cadenas separadas (subunidades) para formar una proteína completa. (2.5)
Superenrollada: una molécula de DNA que tiene más o menos 10 pares de bases por vuelta de la hélice. (10.3)
Superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF): gran variedad de proteínas que contienen dominios compuestos de 70 a 110 aminoácidos similares a los dominios que componen las cadenas polipeptídicas de los anticuerpos de la sangre. (7.3, 17.1)
Superficie citosólica: superficie de la membrana opuesta al citosol. (8.3)
Sustrato: reactante unido por una enzima. (3.2)
Sustratos del receptor a la insulina: proteínas de sustrato que al fosforilarse en respuesta a la insulina se unen y activan una variedad de efectores “corriente abajo”. (15.4)

tDNA: el DNA que codifica tRNA. (11.3)
Técnica de criofractura: en esta técnica analítica se congela primero una muestra de tejido y luego se fractura a lo largo de las líneas de menor resistencia (a menudo se reconoce una línea de fractura entre dos capas lipídicas); entonces se deposita polvo metálico en las superficies expuestas para crear una imagen sombreada óptica que se analiza mediante microscopia electrónica. (14.4, 18.2)
Técnica de criograbado: técnica analítica en la cual el tejido se congela y fractura; luego se expone al vacío por un periodo breve, de tal forma que una pequeña capa de hielo puede evaporarse de la superficie y ello permite que las superficies fracturadas expongan sus características para identificarlas por medio de microscopia electrónica. (18.2)
Técnica de fijación: esta técnica sirve para estudiar el paso de los iones por los canales iónicos; se lleva a cabo al pinzar, o mantener el voltaje, a través de un fragmento de membrana; se sella un electrodo micropipeta a la superficie y entonces se mide la corriente que

transita por la porción de la membrana. (4.5)

Tejido conjuntivo: tejido que consta en mayor medida de una variedad de fibras bien definidas que interactúan entre sí de maneras específicas. La capa más profunda de la piel (la dermis) es un tipo de tejido conjuntivo. (7)

Tejido epitelial: tejido formado por células densamente empacadas que recubren los espacios internos del cuerpo. La capa externa de la piel (la epidermis) es un tipo de tejido epitelial. (7)

Telofase: etapa final de la mitosis en la cual las células hijas vuelven a la condición de interfase: el huso mitótico se desensambla, vuelve a formarse la envoltura nuclear, y los cromosomas se dispersan cada vez más hasta que desaparecen de la vista al microscopio. (14.2)

Telomerasa: enzima evolutivamente nueva que puede agregar nuevas unidades repetitivas de DNA al extremo 3′ de la cadena saliente de un telómero. Es una transcriptasa inversa que sintetiza DNA usando una plantilla de RNA. (12.1)

Telómero: una secuencia poco usual de secuencias repetidas que forma un casquete en cada extremo del cromosoma. (12.1)

Temperatura de transición: temperatura en la que una membrana pasa de un estado líquido a un gel cristalino; en este estado el movimiento de la molécula lipídica se reduce en gran medida. (4.5)

Teoría celular: teoría de la organización biológica basada en tres postulados; todos los organismos están conformados por una o más células; la célula es la unidad básica estructural de la vida; las células sólo provienen de la división de las células preexistentes. (1.1)

Teoría de la selección clonal: teoría bien fundamentada que sostiene que los linfocitos B y T desarrollan su capacidad para producir anticuerpos específicos o receptores para célula T antes de la exposición del antígeno. Cuando entra un antígeno al cuerpo, éste puede interactuar de forma específica con linfocitos B y T que portan los receptores complementarios. La interacción entre los antígenos y los linfocitos B o T lleva a la proliferación de los linfocitos para formar un clon de células capaces de responder a un antígeno específico. (17.2)

Teoría endosimbiótica: propuesta basada en evidencias según la cual la mitocondria y los cloroplastos provienen de procariotas simbióticos que tomaron residencia dentro de una célula hospedadora primitiva. (VE1)

Terapia génica: proceso por el cual un paciente se somete a la modificación del genotipo de células enfermas. (PH4)

Terapia inmunitaria: tratamiento de una enfermedad, incluidos el cáncer y los trastornos autoinmunitarios, que suponen el uso de anticuerpos o células inmunitarias. (16.4, PH17)

Termodinámica: rama de la física que se encarga del estudio de los cambios de la energía acompañados de los sucesos que tienen lugar en el universo físico. (3.1)

Tétrada (bivalente): el complejo formado durante la meiosis por un par de cromosomas homólogos en sinapsis que incluye cuatro cromátides. (14.3)

Tilacoides: sacos membranosos aplanados formados por la membrana interna de los cloroplastos que contienen la maquinaria para traducir energía para la fotosíntesis. (6.1)

Tilacoides de estroma: también llamados lamelas del estroma, son cisternas membranosas aplanadas que conectan con algunas tilacoides de un grano con los de otro grano. (6.1)

Tinción negativa: procedimiento en el cual se recogen depósitos de metales pesados en una rejilla con espécimen para microscopia electrónica, excepto de las localizaciones en las que las partículas son muy pequeñas, incluidos los agregados de gran peso molecular, como virus, ribosomas, enzimas de multisubunidades, elementos del citoesqueleto y complejos de proteínas. (18.2)

Tipo silvestre: cepa original de un organismo vivo de la cual se obtienen otros individuos para investigación. (10.2)

Tolerancia inmunológica: estado en el cual el cuerpo no reacciona contra una sustancia en particular, como las proteínas propias del organismo, debido a que las células pueden generar tal respuesta, sea porque se han inactivado o destruido. (17.1, PH17)

Tonoplasto: membrana que une la vacuola de una célula vegetal. (8.7)

Topoisomerasas: enzimas encontradas en procariotas y eucariotas capaces de cambiar el estado superenrollado del dúplex del DNA. Son esenciales en los procesos, como la replicación del DNA y la transcripción, que requieren un DNA dúplex desenrollado. (10.3)

Traducción: síntesis de proteínas en el citoplasma mediante la información codificada en un mRNA. (11.1, 11.8)

Transcripción: formación de un RNA a partir de un DNA molde. (11.1)

Transcripción primaria (pre-RNA): molécula de RNA inicial sintetizada a partir del DNA, que es equivalente en longitud al DNA a partir del cual se transcribió. Por lo regular, las transcripciones primarias tienen una existencia corta y se procesan en RNA funcionales más pequeños por una serie de reacciones de procesamiento. (11.2)

Transcriptasa inversa: polimerasa de DNA dependiente de RNA. Es una enzima que utiliza al RNA como molde para sintetizar una cadena complementaria de DNA. Se encuentra en los virus que contienen RNA y se usa en el laboratorio para sintetizar cDNA. (10.5)

Transducción: la conversión de energía de un tipo a otro, como la conversión de energía química a energía calórica cuando el combustible se consume; también es la transferencia de DNA dentro de las células mediada por virus. (18.7)

Transducción de señales: proceso global en el que la información transportada por moléculas mensajeras extracelulares se traduce en cambios que ocurren dentro de una célula. (15.1)

Transfección: proceso mediante el cual se introduce DNA desnudo dentro de células en cultivo, que suele dar por resultado la incorporación del DNA en el genoma celular y su ulterior expresión. (18.7)

Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET): técnica para medir cambios en la distancia entre dos partes de una proteína (o entre dos proteínas separadas dentro de una estructura mayor). Se basa en la transferencia de energía de un fluorocromo donante a uno aceptor, lo que cambia la intensidad de fluorescencia de las dos moléculas. (fig. 18-8)

Transferencia lateral de genes: transferencia de genes de una especie a otra. (VE1)

Transformación: captación de DNA desnudo en una célula que lleva al cambio hereditario del genoma celular. (PH10)

Transformada: células normales convertidas en células cancerosas por la acción del tratamiento con carcinógenos químicos, radiación o virus tumorales infectivos. (16.1)

Transgén: un gen que se ha incorporado de manera estable en un genoma celular por el proceso de transfección. (18.7)

Translocón: canal cubierto de proteína inmerso en la membrana del ER; el polipéptido naciente puede moverse a través del translocón al pasar del citosol a la luz del ER. (8.3)

Transporte activo: proceso que requiere energía y en el cual un sustrato se une a una proteína transmembranosa específica, lo que cambia su conformación para permitir el paso de una sustancia a través de la membrana en contra de un gradiente electroquímico formado por esta sustancia. (4.7)

Transporte axónico: proceso por medio del cual las vesículas, los polímeros de citoesqueleto y las macromoléculas se llevan a lo largo de los microtúbulos

dentro del axón de una neurona. El transporte anterógrado mueve materiales del cuerpo de la célula a las terminales sinápticas, aunque el transporte retrógrado desplaza materiales en dirección opuesta. (9.3)

Transporte facilitado: proteína transmembranosa que se une a una sustancia específica; al hacerlo, la proteína cambia su conformación para facilitar la difusión de la sustancia en contra de un gradiente de concentración. (4.7)

Transporte intraflagelar IFT: proceso en el cual las partículas se mueven en ambas direcciones entre la base de los flagelos o cilios y la punta de éstos. La fuerza del transporte intraflagelar la generan proteínas motoras que crean tracción a lo largo de los dobletes periféricos del axonema. (9.3)

Transporte vesicular: lanzadera formada por la gemación del compartimiento membranoso, que lleva materiales entre los organelos. (8.1)

Transposición: aberración cromosómica que resulta cuando la totalidad o una parte de un cromosoma se une a otro cromosoma. (PH12)

Transposición: movimiento de segmentos del DNA de un lugar en un cromosoma a otro sitio del todo distinto, a menudo con alteración de la expresión de los genes. (10.5)

Transposición: tercer paso en el ciclo de traducción y elongación que incluye: a) expulsión de un tRNA no cargado desde el sitio P y b) movimiento de los tres nucleótidos del ribosoma (un codón) a lo largo del mRNA en la dirección 3′. (11.8)

Transposones: segmentos de DNA capaces de moverse de un lugar en el genoma a otro. (10.5)

Trastornos por almacenamiento lisosómico: enfermedades caracterizadas por la deficiencia de una enzima lisosómica y la acumulación correspondiente de sustrato no degradado. (PH8)

Triacilgliceroles: polímeros integrados por un esqueleto de glicerol unido por enlaces éster a tres ácidos grasos; se conocen como grasas. (2.5)

Trifosfato de adenosina (ATP): nucleótido que consiste en adenosina unida a tres grupos fosfato; es la principal fuente de energía inmediata para las células procariotas y eucariotas. (2.5, 3)

Trifosfato de guanosina (GTP): nucleótido de gran importancia en las actividades celulares. Se une a diversas proteínas (llamadas proteínas G) y actúa como un interruptor que "enciende" las actividades de éstas. (2.5)

Trisomía: complemento cromosómico que tiene un cromosoma adicional, por ejemplo, un tercer cromosoma homólogo. (PH14)

Tubulina: proteína que reviste las paredes de los microtúbulos. (9.3)

Tubulina γ: un tipo de tubulina que constituye un componente crítico en la nucleación de microtúbulos. (9.3)

Túbulos transversos: plegamientos membranosos en los cuales el impulso generado en una célula de músculo esquelético se propaga al interior de la célula. (9.6)

Tumor benigno: tumoración compuesta por células que no responden a los controles normales del crecimiento, pero que no tienen la capacidad de invadir los tejidos normales o dar metástasis a sitios distantes. (16.3)

Ubiquinona: componente de la cadena de transporte de electrones; es una molécula liposoluble que contiene una larga cadena hidrófoba formada por unidades isoprenoides de cinco carbonos. (5.3)

Ubiquitina: proteína pequeña sumamente conservada que se une a las proteínas como blanco para su degradación en proteosomas. (12.7)

Umbral: punto límite durante la despolarización de una célula excitable donde los canales de compuerta de sodio se abren; como resultado, el sodio entra y genera un breve cambio en el potencial de membrana. (4.8)

Unidad de transcripción: segmento correspondiente de DNA en el cual una transcripción primaria se somete a transcripción. (11.4)

Unidad fotosintética: grupo de varios cientos de moléculas de clorofila que actúan juntas para atrapar fotones y transferir energía a la molécula pigmentaria que está en el centro de la reacción. (6.4)

Unión neuromuscular: punto de contacto de una terminal de un axón con una fibra muscular; la unión neuromuscular es el sitio de transmisión de los impulsos nerviosos desde los axones a través del espacio sináptico hasta la fibra muscular. (4.8, 9.6)

Uniones comunicantes: sitios entre las células animales especializados en la comunicación intercelular. Las membranas plasmáticas de las células adyacentes tienen un espacio de unos 3 nm entre sí, y el espacio es cubierto por muy finas "tuberías", o conexones que permiten el paso de pequeñas moléculas. (7.5)

Uniones de adherencia (*zonulae adherens*): tipo de uniones adhesivas especializadas y comunes del epitelio. Las membranas plasmáticas en esta región están separadas por 20 a 35 nm y son los puntos donde se concentran las moléculas de caderina. Las células se mantienen juntas por medio de las uniones entre los dominios extracelulares de las moléculas de caderina y forman puentes en los espacios entre las células contiguas. (7.3)

Uniones estrechas: contactos especializados que ocurren en el extremo más apical de los complejos de unión formados entre las células epiteliales adyacentes. Las membranas contiguas hacen contacto en puntos intermitentes, donde las proteínas integrales de las dos membranas adyacentes están muy próximas. (7.4)

Uniones V(D)J: ordenamientos de DNA que suceden durante el desarrollo de las células B y que limitan a las células para producir especies de anticuerpos específicos. (17.4)

Vacuola: estructura llena de líquido rodeada por una membrana simple; constituye hasta 90% en volumen de muchas células vegetales. (8.7)

Vaina de mielina: material rico en lípidos que envuelve a la mayoría de las neuronas de los vertebrados. (4.8)

Vector de DNA: vehículo para portar DNA extraño en un célula hospedadora disponible, como la bacteria *E. coli*. El vector contiene secuencias que permiten a éste replicarse dentro de la célula hospedadora. Más a menudo los vectores son plásmidos o virus de bacterias de tipo lambda (λ). Una vez que el DNA se encuentra dentro de la bacteria, se replica y segrega a las células hijas. (18.13)

Velocidad máxima ($V_{máx}$): velocidad más alta adquirida para una reacción catalizada por enzimas; se observa cuando la enzima se satura con sustrato. (3.2)

Vesículas cubiertas: vesículas que surgen del compartimiento membranal; de manera característica poseen una proteína de multisubunidad como cubierta que promueve el proceso de gemación y une proteínas específicas de membrana. **COPI**—, **COPII**— y las vesículas cubiertas de clatrina son las vesículas cubiertas mejor caracterizadas. (8.5)

Vesículas sinápticas: los sitios de almacenamiento para los neurotransmisores dentro de la terminal del axón neuronal. (4.8)

Vía anabólica: vía metabólica que da lugar a la síntesis de productos complejos relacionados. (3.3)

Vía biosintética (vía de secreción): ruta directa del citoplasma en la cual los materiales se sintetizan en el retículo endoplásmico o aparato de Golgi, se modifican durante su paso a través de este último y se transportan dentro del citoplasma a diversos destinos, como la membrana plasmática, un lisosoma o vacuolas gigantes en una célula vegetal. El término alternativo de vía secretora se ha empleado debido a que muchos de los materiales sintetizados en la vía se destinan a la descarga en la célula. (8.1)

Vía C_3: vía metabólica a través de la cual el dióxido de carbono se asimila en moléculas orgánicas de la célula durante la fotosíntesis. La ribulosa 1,5-difosfato (RuBP) se utiliza en el aceptor inicial CO_2, el cual se fragmenta entonces en moléculas de dos o tres carbonos PGA. (6.6)

Vía C_4 (Hatch-Slack): vía alternativa para la fijación de carbono mediante fosfoenolpiruvato combinado con CO_2 para generar compuestos de cuatro carbonos (de manera predominante malato y oxalacetato). (6.6)

Vía catabólica: vía metabólica en la cual las moléculas complejas se degradan hasta sus productos más simples. (3.3)

Vía de secreción (vía biosintética): ruta a través del citoplasma por la que los materiales se sintetizan en el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi, se modifican durante el paso por el aparato de Golgi y se transportan dentro del citoplasma a diferentes destinos, como la membrana plasmática, un lisosoma o una gran vacuola en una célula vegetal. Muchos de los materiales sintetizados en el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi se destinan a su expulsión de la célula; es por ello que se utiliza el término vía de secreción. (8.1)

Vía endocítica: ruta para el movimiento de materiales desde el lado externo de la célula (y la superficie membranosa de la célula) hasta los compartimientos, como los endosomas y lisosomas, localizados en el interior celular. (8.1, 8.8)

Vía metabólica: serie de reacciones químicas cuyo resultado es la síntesis de un producto terminal importante para la función celular. (2.4)

Vías de señalización: supercarreteras de información de la célula. Cada una consiste en una serie de proteínas bien definidas que operan en secuencias. Cada proteína en la vía actúa modificando la conformación de la proteína corriente abajo en la serie. (15.1)

Vida media: medida de la inestabilidad de un radioisótopo o, de manera equivalente, la cantidad de tiempo requerido para que la mitad del material radiactivo se desintegre. (18.4)

Virión: forma que asume el virus fuera de la célula y que posee un núcleo de material genético rodeado por una cápsula de proteína o lipoproteína. (1.4)

Viroides: pequeños patógenos intracelulares obligados que, a diferencia de los virus, tienen sólo material genético circular de RNA. (1.4)

Virus: pequeños agentes patógenos intracelulares obligados que no se consideran vivos, puesto que no se pueden dividir de manera directa; esta división es necesaria para la teoría celular de la vida. (1.4)

Virus tumorales de DNA: virus capaces de infectar células de vertebrados y transformar éstas en células cancerosas; los virus de DNA tienen DNA en la partícula vírica madura. (16.2)

Virus tumorales de RNA: virus capaces de infectar células de vertebrados y transformarlas en células cancerosas. Los RNA víricos tienen RNA en las partículas víricas maduras. (16.2)

Índice alfabético

NOTA: una *f* después de un número de página denota una figura; *c* refiere un cuadro; *np* significa nota de pie de página; *PH* alude a un recuadro Perspectiva humana; *VE* denota un recuadro Vías experimentales.

O

S